

SOMATISCHE UND AUTOSOMALE
PHOSPHOGLYCERATKINASE
DER MAUS: BIOCHEMISCHE,
IMMUNOLOGISCHE
UND ZELLBIOLOGISCHE
UNTERSUCHUNGEN
IN VIVO UND IN VITRO

Gesa Haedenkamp

SOMATISCHE UND AUTOSOMALE PHOSPHOGLYCERATKINASE DER
MAUS: BIOCHEMISCHE, IMMUNOLOGISCHE UND ZELLBIOLOGISCHE
UNTERSUCHUNGEN IN VIVO UND IN VITRO

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Gesa Haedenkamp
aus München

München, März 1986

Referent: Prof. Dr. H. Cleve

Koreferent: Prof. Dr. W. Gutensohn

Sondergutachter: Prof. Dr. W. Krietsch

Tag der mündlichen Prüfung: 20.6.1986

Heiliger St. Fazekas,
mach' mit meinen Klonen was!

(stopset eines ge-
plasten Klonisten)

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1.	EINFÜHRUNG	1
2.	MATERIAL UND METHODEN	6
2.1	Materialien	6
2.2	Puffer und Medien	6
2.2.1	Elektrophoresen	6
2.2.2	Antikörperpuffer	6
2.2.3	ELISA-Lösungen	7
2.2.4	Zellkultur	7
2.2.5	Spermienpräparation	7
2.3	Mäuse und Tierhaltung	8
2.4	Organpräparation	8
2.4.1	Blutplasma	8
2.4.2	Hoden	8
2.4.3	Spermien	9
2.4.4	Milz	9
2.5	PGK-Präparation	9
2.5.1	PGK-2	9
2.5.2	PGK-1	10
2.5.3	Cellogel-Elektrophorese	10
2.5.4	Polyacrylamidgel-Elektrophorese	11
2.5.5	PGK-Aliquotierung	11
2.5.6	PGK-Aktivitätsbestimmung	11
2.6	Immunisierung	13
2.6.1	Aktive Immunisierung für die Fertilitätsuntersuchung	13
2.6.2	Herstellung polyklonaler Antikörper	13
2.6.3	Produktion monoklonaler Antikörper	13
2.7	Protein A-Sepharose Chromatographie	13
2.8	ELISA	14
2.8.1	Konjugat	14
2.8.2	Antikörperbestimmung	14
2.9	Hybridoma-Herstellung	15
2.9.1	Fusion	15
2.9.2	Kultivierung	15
2.9.3	Klonierung	16
2.9.4	Ascitesproduktion	16
2.10	Ammoniumsulfatfällung	16

2.11	Proteinbestimmung	17
2.12	Immundoppeldiffusion	17
2.13	Immunfluoreszenz	17
2.13.1	Spermien	17
2.13.2	Hodenschnitte	18
2.14	Fibroblastenkultur	18
2.14.1	Primärkultur	18
2.14.2	Trypsinierung	19
2.14.3	Berechnung der Vermehrungsrate	19
2.14.4	Vorbereitung der Zellen für die PGK-Elektrophorese	19
2.14.5	Karyogramme	20
3.	ERGEBNISSE	21
3.1	PGK-2: Biochemische und katalytische Eigenschaften	21
3.1.1	Abhängigkeit der Aktivität von der Ionenkonzentration	21
3.1.2	Temperaturstabilität	21
3.1.3	Titration der Sulfhydrylgruppen	23
3.1.4	Nucleotidspezifität	24
3.1.5	Michaelis-Menten-Konstanten	25
3.1.6	Hemmung mit Adipoyldihydrazo-ATP	27
3.2	ELISA	28
3.2.1	Standardisierung	28
3.2.2	Referenzkurven	30
3.3	Fertilitätsuntersuchung	32
3.3.1	Immunantwort	32
3.3.2	Fertilität	34
3.4	Polyklonale Antikörper	37
3.4.1	Ascites-Antikörper	37
3.4.2	anti-PGK-2 Plasma-Pool	39
3.5	Monoklonale Antikörper	43
3.5.1	Fusion	43
3.5.2	Klonierung	44
3.5.3	Hybridomaauswahl	46
3.5.4	Subklassen	50
3.5.5	Vergleich der Affinitäten	51
3.5.6	Eliminierung der Kreuzreaktivität	52
3.5.7	Kompetitiver ELISA	53
3.5.8	Hemmung der PGK-Aktivität	56
3.6	Immunfluoreszenz an Spermien	57

	Seite
3.6.1	Spermienpräparation 57
3.6.2	Spermienfluoreszenz 60
3.6.3	Kreuzreaktivität 70
3.6.4	Hodenschnitte 72
3.7	Fibroblasten 73
4.	DISKUSSION 81
4.1	Physikalische und chemische Eigenschaften 81
4.2	Fertilitätskontrolle 84
4.3	Antikörper gegen PGK 87
4.4	Spermienimmunfluoreszenz 89
4.5	Heterozygote Fibroblastenkulturen 91
5.	ZUSAMMENFASSUNG 94
6.	LITERATURVERZEICHNIS 96
7.	ABKÜRZUNGEN 104

1. EINFÜHRUNG

Die monomere Phosphoglyceratkinase (PGK, EC 2.7.2.3) katalysiert die erste Substratkettenphosphorylierung in der Glycolyse, den reversiblen Phosphattransfer von 1,3-Bisphosphoglycerat auf ADP unter Bildung von 3-Phosphoglycerat und ATP (Bücher, 1947; Blake und Rice, 1981). Das somatische Isozym ist X-chromosomal codiert (Kozak et al., 1974) und wird im allgemeinen mit PGK-A bezeichnet, bei Mäusen jedoch mit PGK-1. Die Entdeckung einer elektrophoretischen Variante PGK-1A neben dem Wildtyp PGK-1B (Nielsen und Chapman, 1977) ermöglichte die Verwendung dieses Enzyms als cytologischen Marker bei Untersuchungen der X-Chromosomen-Inaktivierung (Gartler und Riggs, 1983). In spermienenthaltenden Testes und Epididymides von Theria (lebendgebärende Säuger) wurde eine andere PGK-Form nachgewiesen, PGK-B, bei Mäusen PGK-2, die in anderen Geweben der meisten Eutheria (Placentatiere) überhaupt nicht oder, bei Metatheria (Ordnung Marsupialia, Beuteltiere), auch in Erythrocyten auftritt, jedoch mit wesentlich geringerer Aktivität im Vergleich zur somatischen PGK (VandeBerg et al., 1973). Der dazugehörige Genlocus befindet sich bei Mäusen auf Chromosom 17 in enger Kopplung mit dem H2-Komplex (Eicher et al., 1978; VandeBerg und Klein, 1978). Auch weibliche Tiere besitzen demnach das Pgk-2-Gen, ohne jedoch den Phänotyp PGK-2 zu exprimieren. Soweit bisher bekannt, wird das autosomale Isozym bei Mäusen nur in Spermien exprimiert (Rudolph und VandeBerg, 1980) und durch drei Allele spezifiziert: Pgk-2^a, Pgk-2^b und Pgk-2^c (VandeBerg et al., 1976; VandeBerg und Blohm, 1977; Klein et al., 1978). Beim Menschen konnten zwei PGK-Gensequenzen dem X-Chromosom zugeordnet werden, wobei es sich bei einer um das funktionelle, bei der anderen um ein prozessiertes Pseudogen handelt (Michelson et al., 1983, 1985). Autosomale DNA-Sequenzen wurden auf Chromosom 6, gekoppelt mit der HLA-Region, und auf Chromosom 19 lokalisiert (Szabo et al., 1984; Willard et al., 1985).

Spermien-spezifische Varianten sind auch von Diaphorase, Phosphodiesterase, Hexokinase, Carboanhydrase, Cytochrom c, basischen Kernproteinen und insbesondere von der Lactat-Dehydrogenase bekannt (vgl. Übersicht von Goldberg, 1977). Die funktionelle Bedeutung dieser Gewebespezifität ist jedoch noch völlig ungeklärt. Für LDH-C₄, dem bisher am genauesten untersuchten spermien-spezifischen Enzym, wird eine Rolle beim Einschleusen von Reduktionsäquivalenten aus dem Cytosol in die

Mitochondrien postuliert (Blanco, 1976; Storey und Kayne, 1977). Im Falle der PGK liegt die Vermutung nahe, daß im reifen, haploiden Spermatozoon – das X-Chromosom ist ab der meiotischen Prophase inaktiviert – ein autosomales Isozym zur Aufrechterhaltung energieliefernder Prozesse erforderlich ist (Erickson, 1976; Hotta und Chandley, 1982). Die niedrige enzymatische Aktivität der PGK-2C und die schlechten Züchtungseigenschaften von Pgk-2^C-Mäusestämmen (VandeBerg, 1977) deuten ferner auf einen möglichen, bislang jedoch noch nicht gesicherten Zusammenhang zwischen Enzym und Fertilität hin. Die Entwicklung eines Präparationsverfahrens mit hoher Ausbeute an reiner Maus-PGK (Kuntz et al., 1978; Obermaier, 1984) ermöglichte die während der vorliegenden Arbeit durchgeführte Bestimmung einiger noch ausstehender Charakteristika der PGK-2, die im Falle von Unterschieden zur PGK-1 (Mühlbacher et al., 1983) Rückschlüsse auf Lokalisation und Funktion in Spermien erlauben sollten.

Die PGK eignet sich angesichts des seltenen Allels Pgk-1^a und des Polymorphismus von PGK-2 bei Mäusen besonders zur Erforschung selektiver Genregulation und klonaler Gewebsdifferenzierung. Das bisher empfindlichste System zur Unterscheidung der verschiedenen PGK-Formen stellt die Cellogelelektrophorese von Gewebeextrakten mit fluorimetrischer Auswertung dar (Bücher et al., 1980), mit der noch 1 µU Enzymaktivität erfaßt werden kann, nicht jedoch inaktive PGK-Anteile. Die PGK-Expression in Embryonen vor der Implantation, insbesondere im Trophectoderm und der inneren Zellmasse, kann nur mittels Immunfluoreszenz dargestellt werden. Die Hybridomatechnik (Köhler und Milstein, 1975) schuf die Voraussetzung für den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Versuch, monoklonale, monospezifische Antikörper zu erzeugen, mit deren Hilfe die PGK-Allozyme und -Isozyme nicht nur in situ immunhistochemisch exakt lokalisiert, sondern auch ontogenetische Analysen der PGK-Regulation wie Ein- und Abschaltung des autosomalen Gens und Genaktivität in der frühen Embryonalentwicklung durchgeführt werden sollten.

Die humanmedizinische Literatur enthält zahlreiche Beispiele für im weiblichen Organismus natürlich auftretende und durch Immunisierung mit Spermien künstlich induzierte Antikörper, deren Antigene jedoch erst mühsam identifiziert werden müssen (vgl. Rose et al., 1976; Jones, 1983). Mit der LDH-C₄ gelang, obwohl in Cytoplasma und Mitochondrien lokalisiert, experimentell bereits eine signifikante Reduktion von Schwan-

gerschaften nach passiver und aktiver Immunisierung weiblicher Mäuse, bzw. Kaninchen (Übersicht vgl. Goldberg, 1977). Da die Spermiogenese erst in der Pubertät einsetzt, werden spermienspezifische Antigene auch im männlichen Organismus nicht vom Mechanismus der natürlichen Immuntoleranz erfaßt und erscheinen somit als geeignete Kandidaten für eine immunologisch gesteuerte Fertilitätskontrolle. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde geprüft, ob eine aktive Immunisierung weiblicher und männlicher Mäuse, gefolgt von Verpaarung mit unbehandelten Tieren, zu einer reduzierten Fertilität und damit zu verminderten Wurfgrößen führen würde.

Aus der großen Übereinstimmung der Eigenschaften von PGK-1A und PGK-1B wird kein Selektionsvorteil für eines der beiden Allozyme ersichtlich (Mühlbacher et al., 1983). Jedoch ist das infolge der Inaktivierung eines der beiden X-Chromosomen in Somazellen weiblicher, adulter, Pgk-1^a/Pgk-1^b-heterozygoter Mäuse entstehende, phänotypische Mosaik nicht balanciert. In Gewebeextrakten beträgt das Verhältnis der beiden Enzymaktivitäten nicht 1:1, sondern 60-70% PGK-1A zu 30-40 % PGK-1B (z.B. West und Chapman, 1978; Papaioannou et al., 1981). Dieser Effekt der nicht zufälligen X-Chromosom-Inaktivierung wurde einer zusätzlichen Heterozygotie für das X-Chromosom-kontrollierende Element Xce zugeschrieben (Johnston und Cattanaach, 1981), das mit dem Pgk-Locus eng gekoppelt ist und dessen Allele die Wahl des zu inaktivierenden X-Chromosoms beeinflussen (Cattanaach, 1975): X-Chromosomen mit dem Xce^a-Allel werden eher inaktiviert als solche mit dem Xce^b- oder Xce^c-Allel. Bei Untersuchungen über den klonalen Ursprung von Karzinomen zeigte sich, daß 85 % chemisch induzierter, präneoplastischer Noduli im Lebergewebe von Pgk-1^aXce^c/Pgk-1^bXce^a-doppelt-heterozygoten Mäusen den Phänotyp PGK-1A exprimierten (Rabes et al., 1982). Aufgrund dieser Befunde wurde während der vorliegenden Arbeit auch das PGK-1A:PGK-1B-Verhältnis von Fibroblastenkulturen Pgk-1-heterozygoter Mäuse mit homo- oder heterozygotem Xce-Genotyp über mehrere Passagen verfolgt, um festzustellen, ob das Mosaik wie im Gewebe konstant bleibt oder sich wie im Falle der präneoplastischen Noduli zu einem Zelltyp hin verschiebt.

Die wesentlichen Ziele der vorliegenden Arbeit lassen sich zusammenfassend wie folgt darstellen:

- 1) Bestimmung und Vergleich der biochemischen und kinetischen Eigenschaften von PGK-1 und PGK-2 zur Vertiefung der Kenntnis über die

physiologische Funktion des spermien-spezifischen Isozyms;

- 2) Untersuchungen über die Anwendbarkeit des spermien-spezifischen Antigens PGK-2 bei einer immunologischen Fertilitätskontrolle;
- 3) Erzeugung monospezifischer, monoklonaler Antikörper für die Lokalisation der PGK-2 in Spermien und für die Mosaikdarstellung der PGK-Allozyme und -Isozyme in Präimplantationsembryonen;
- 4) Studium der PGK-1A/PGK-1B-Mosaik von Fibroblastenkulturen in Abhängigkeit vom Xce-Genotyp.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 MATERIALIEN

Enzyme und Substrate wurden bezogen von der Firma Boehringer GmbH (Mannheim), allgemeine Laborchemikalien von Merck (Darmstadt) und Sigma (Taufkirchen), Cellogel von Chemetron (Mailand), Immunchemikalien von Sigma, Chromatographiegele von Pharmacia (Freiburg), Zellkulturmedien von Gibco (Karlsruhe), Fötales Kälberserum von Medaq (Hamburg) oder Boehringer (Mannheim), Antibiotika von Seromed (Berlin) und Zellkulturgefäße von Nunc (Wiesbaden) und Falcon (Heidelberg). Weitere Bezugsquellen sind im Text vermerkt.

2.2 PUFFER UND MEDIEN

2.2.1 Elektrophoresen

Cellogel:

20 mM Diäthylbarbiturat, pH 8.6; 10 mM Na-Citrat; 5 mM MgSO_4 ; 2 mM EDTA; zusätzlich 0.65 mM DTE und 1.0 mM AMP in der Kathodenkammer;

SDS-Polyacrylamidgel:

Laufpuffer: 25 mM Tris/HCl, pH 8.3; 195 mM Glycin; 0.1 % SDS;
Probenpuffer: 65 mM Tris/HCl, pH 6.8; 3 % SDS; 5 % Mercaptoäthanol; 10 % Glycerin; 0.01 % Bromphenolblau;

2.2.2 Antikörperpuffer

Borat-Saline: pH 8.4

100 mM Borsäure; 25 mM Borax; 75 mM NaCl; 0.05 % NaN_3 ;

Tris-Saline: pH 8.0

50 mM Tris; 150 mM NaCl; 1.0 mM MgCl_2 ; 0.05 % NaN_3 ;

Protein A - Sepharose Chromatographie:

50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 8.6;

50 mM Na_2HPO_4 , 150 mM NaCl, pH 7.0;

50 mM Na-Citrat, 150 mM NaCl, pH 5.5;

50 mM Na-Acetat, 150 mM NaCl, pH 4.3;

50 mM Glycin/HCl, 150 mM NaCl, pH 2.3;

2.2.3 ELISA-Lösungen

Phosphatgepufferte Saline (PBS): pH 7.2

6 mM Na_2HPO_4 ; 4 mM KH_2PO_4 ; 150 mM NaCl;

Beschichtungspuffer: pH 8.6

0.1 M NaHCO_3 in H_2O ;

Waschlösung:

150 mM NaCl; 0.05 % (w/v) Tween 20;

Verdünnungspuffer PBS/Tween:

0.05 % (w/v) Tween 20 in PBS;

Substrat:

1mg/ml Na_2 -para-Nitrophenylphosphat (NPP) in 1M Diäthanolamin, pH 9.8;

1.0 mM MgCl_2 ;

2.2.4 Zellkultur

Antibiotika:

pro Liter Zellkulturmedium

100 000 U Penicillin, 100 mg Streptomycin; 2.5 mg Fungizon;

Myeloma-Medium (MY):

RPMI 1640 mit 4.5 g/l Glucose, 2.0 mM L-Glutamin, 0.1% Mercapto-
äthanol, 10% Fötale Kälberserum (FCS);

Hybridoma-Medium (HY):

RPMI 1640 mit 4.5 g/l Glucose, 2 mM L-Glutamin, 20 % FCS, 0.2 U/ml
Rinderinsulin, 0.5 mM Na-Pyruvat, 1.0 mM Oxalessigsäure;

HT-Medium:

HY-Medium mit 100 μM Hypoxanthin, 16 μM Thymidin;

HAT-Medium:

HT-Medium mit 0.4 μM Aminopterin;

Fibroblastenmedium:

45 % DMEM; 5 % F-12; 10 % FCS;

Dulbeccos phosphatgepufferte Saline ohne Ca^{2+} , Mg^{2+} (PBS-d): pH 7.2

140 mM NaCl; 2.7 mM KCl; 8.0 mM Na_2HPO_4 ; 1.5 mM KH_2PO_4 ;

Einfriermedium

RPMI 1640 mit 25 % FCS, 12 % Glycerin;

2.2.5 Spermienpräparation

OKUDA / BRAUN - Medium (Toyoda und Chang, 1974)

pH 7.4, 330 mOsm, sterilfiltriert

110 mM NaCl

4,78 mM KCl
 1,19 mM KH_2PO_4
 1,19 mM MgSO_4
 1,71 mM CaCl_2
 0,34 mM Na-Pyruvat
 22,62 mM NaHCO_3 oder 25 mM Hepes
 21,58 mM Na-Lactat (3,68 ml/l 60% Sirup)
 1,0 g/l D(+)-Glucose
 1,5 % (w/v) BSA
 100 000 U/l Penicillin
 100 mg/l Streptomycin

2.3 MÄUSE UND TIERHALTUNG

Die C3H/Aa-Pgk-1^{a2b} Linie (mehr als 20 Inzuchtgenerationen) resultierte aus Wildmaus x C3H/Aa-Pgk-1^{b2b} Hybriden, die von Dr. T. Nielsen (Institut für Ökologie und Genetik, Universität Aarhus, Schweden) zur Verfügung gestellt worden waren. C3H/HeH-Pgk-1^{b2b} entstammten dem laboreigenen Inzuchtstamm. Prof. J. Klein (Max-Planck Institut für Biologie, Tübingen) überließ uns einige 129/Sv-Pgk-1^{b2c} Mäuse zur Züchtung. Die Balb/c-Pgk-1^{b2a} und NMRI-Pgk-1^{b2a}/Pgk-1^{b2b} Mäuse stammten von ursprünglich vom Zentralinstitut für Versuchstierzucht (Hannover) bezogenen Tieren ab.

Alle Stämme wurden in nicht pathogenfreien Räumen bei einer Temperatur von 23°C, einer Luftfeuchtigkeit von 60% und einem Rhythmus von 12 h Licht / 12 h Dunkel gehalten und mit Altromin-Diätzuchtfutter Nr.1314 und Leitungswasser ad libitum ernährt.

2.4 ORGANPRÄPARATION

2.4.1 Blutplasma

Blutproben aus dem Schwanz wurden in heparinisierten Micro-Hämatocrit-Kapillaren aufgenommen, 30 min abzentrifugiert und das Plasma bei -20°C bis zur ELISA-Antikörperbestimmung eingefroren.

2.4.2 Hoden

Mäusehoden wurden durch einen Einschnitt in das Scrotum entnommen: für PGK-2-Präparationen aus mit CO_2 , für Spermienpräparationen und histologische Schnitte aus durch Genickbruch getöteten Tieren.

2.4.3 Spermien

Der gesamte Nebenhoden wurde in 37°C warmem OKUDA/BRAUN-Medium in einige Teile zerschnitten und diese dreimal gewaschen; die nach jeweils 10 min herausgeschwommenen Spermien wurden vorsichtig abpipettiert und in ein konisches Zentrifugenglas übertragen. Immer noch vorhandene Zelltrümmer und totes Material wurden durch weiteres Absitzenlassen (2x15 min, 37°C), 5 min Zentrifugation bei 200 g und Abpipettieren der schwimmenden Spermien entfernt. Schließlich wurde die Spermien suspension noch einmal in dem Medium, dann zweimal in Tris-Saline gewaschen (4000 g, 5 min) und die Anzahl der Spermien, mittels einer Neubauer-Zählkammer und in Wasser verdünnt, bestimmt.

2.4.4 Milz

Die ausgewachsenen Spendermäuse wurden mit Äther getötet und äußerlich mit 70% Äthanol desinfiziert. Die unter sterilen Bedingungen entnommene (Laminar-Air-Flow) Milz wurde in 5 ml RPMI 1640 (37°C) mit Schere und Pinzette zerkleinert und die Zellen nach Zugabe von weiteren 5 ml Medium suspendiert. Nach 2-3 min Absetzen von Gewebestücken in einem Plastikröhrchen wurde die Suspension in ein konisches Zentrifugenglas überführt und dreimal gewaschen (400 g, 5 min) – je nach Verwendung mit serumfreien RPMI 1640 (Fusion) oder mit Hybridoma-Medium (Macrophagen). Die für eine Fusion bestimmten Milzzellen wurden in einer Neubauer-Zählkammer gezählt, die als Macrophagen-Nährzellschicht benötigten Zellen ungezählt auf Zellkulturgefäße verteilt, wobei der Bedarf mit einer Milz pro 150-180 cm² Wachstumsfläche veranschlagt wurde. Eine stark vergrößerte Milz wurde nicht verwendet, da dies auf Infektion hindeutet.

2.5 PGK-PRÄPARATION

Zur PGK-1-Isolierung wurden Skelettmuskel, für die PGK-2-Isolierung Hoden und Nebenhoden von Hybriden aus C3H- und 101-Mäusen verwendet, die uns freundlicherweise von der Gesellschaft für Strahlenforschung und Umweltschutz zur Verfügung gestellt worden waren.

2.5.1 PGK-2 (Obermaier, 1984)

Alle Schritte wurden mit entgasten Puffern bei 4°C durchgeführt. Die Mäusehoden wurden in 100-150 g Portionen in einem Haushaltsmischer

zerkleinert, 30 min in 50 mM Tris, pH 7.8, 5 mM MgSO_4 (=Puffer A), 0.2 mM DTE gerührt und 1 h bei 100 000 g abzentrifugiert. Nach Entfernung der Fettschicht erfolgte eine Affinitätschromatographie mit ATP-Ribosyl-Adipoyl-Dihydrazo-Sephrose (10 ml Gel pro 100 g Gewebe). Die Säule wurde nach der Auftragung des Rohextraktes mit 1 Säulenvolumen Puffer A, 2 Säulenvolumina Puffer A, 0.7 M NaCl und 1 Säulenvolumen Puffer A gewaschen (30 ml/h). Die adsorbierte PGK wurde mit 2 Säulenvolumina 50 mM Tris, pH 8.0, 50 mM ATP, 80 mM MgSO_4 , 0.2 mM Dithioerythrit (DTE) eluiert (15 ml/h) und die zusammengefaßten PGK-Fraktionen gegen gesättigtes $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dialysiert. Das gefällte Protein wurde in wenig Puffer A aufgenommen und über Sephadex G-75sf chromatographiert (30 ml/h). Nach erneuter Ausfällung der PGK enthaltenden Fraktionen in Ammoniumsulfat und Dialyse gegen 20 mM Tris, pH 7.8, 0.2 mM DTE wurden jeweils 4000 U PGK auf eine 5 ml DEAE-Sephrose-CL6B Säule aufgetragen und die PGK-Isozyme mit einem linearen Gradienten von 80 ml 20-80 mM Tris/HCl, pH 7.8 getrennt (6 ml/h). Die verschiedenen Isozyme wurden in Ammoniumsulfat ausgefällt und aufbewahrt und mittels Cellogel-Elektrophorese identifiziert.

2.5.2 PGK-1 (Kuntz et al., 1978)

Die Präparation unterschied sich in folgenden Punkten von der PGK-2-Isolierung: der ATP-Puls bei der Affinitätschromatographie wurde mit Puffer A, 40 mM ATP, 40 mM MgSO_4 durchgeführt; eine Ionenaustauscher-Chromatographie erübrigt sich hier.

2.5.3 Cellogel-Elektrophorese

Die Identifizierung und Reinheitskontrolle der einzelnen PGK-Isozyme erfolgte mit der Cellogel-Elektrophorese (Bücher et al., 1980). Eine mögliche Interferenz durch Adenylatkinase läßt sich durch 1.0 mM AMP im Kathodenpuffer verhindern. Bei der anschließenden Fluoreszenz-Aktivitätsanfärbung (Krietsch et al., 1977) wird die NADPH-liefernde Indikatorreaktion der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase über die Hexokinasereaktion an das PGK-System gekoppelt. Die quantitative Auswertung der Elektrophoresebanden ermöglicht die Bestimmung der prozentualen Isozymanteile in PGK-Gemischen.

2.5.4 Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Als zusätzliche Reinheitsprüfung wurde die SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese nach der von Kuntz et al. (1978) beschriebenen Methode von Lämmli (1970) durchgeführt. Das Gel wurde hergestellt mit 0.1% SDS, 10% Acrylamid, 0.27% Bisacrylamid, 0.015% Persulfat und 0.0125% TMED in 0.37 M Tris, pH 8.8. Die Trennung der reduzierten Proben erfolgte 5 h bei 220 V und 4°C. Die Gele wurden über Nacht mit Coomassie Brilliant-blau in Methanol/H₂O/Eisessig (4.5/1.0/4.5) angefärbt und im gleichen Lösungsmittelgemisch entfärbt.

2.5.5 PGK-Aliquotierung

Mit gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung ausgefällte, gereinigte PGK-1A, -1B, -2A oder -2B wurde abzentrifugiert, in wenig PBS aufgenommen und über Nacht gegen ca. 500 vol entgaste PBS, 1 mM DTE bei 4°C dialysiert. Nach der Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die Lösung ihrer Verwendung entsprechend (Immunisierung, ELISA, etc.) aliquotiert und bei -20°C eingefroren. Für kinetische Messungen wurde die PGK entsprechend in Tris oder TRA mit DTE dialysiert.

2.5.6 PGK-Aktivitätsbestimmung

Standardtest mit der Rückreaktion

Die PGK-Aktivität wurde mit der rückläufigen Glycolysereaktion bestimmt (Bücher, 1947). Die Testlösung in der Meßküvette setzte sich wie folgt zusammen:

500 µl Testmix: 100 mM Triäthanolamin (TRA) / HCl, pH 7.6

3.3 mM ATP

16 mM 3-Phosphoglycerat (3-PG)

0.3 mM NADH

10 mM MgSO₄

5 µl Glycerinaldehyd-Dehydrogenase (GAPDH; 10 mg/ml, 800 U/ml)

Vorinkubation 10 min, 25°C

Meßreaktion



Indikatorreaktion



Die zu bestimmende PGK wurde mit 0.1 M TRA, pH 7.6, 1mM DTE, 0.1% BSA verdünnt, zur Reaktivierung 20 min bei 0-4°C inkubiert. Nach Zugabe von 10 µl zum Testansatz wurde die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion bei 365 nm, 25°C photometrisch gemessen. 1 U entspricht 1 µmol an verbrauchtem NADH pro Minute ($\epsilon_{\text{NADH}} = 3.4 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Die Bestimmung der Michaelis-Konstanten für 3-PG und ATP wurde mit 0.5-15 mM 3-PG, bzw. 0.07-3.3 mM ATP, und 0.1 U/ml PGK in 550 µl Testansatz durchgeführt.

Bestimmungen mit der Hinreaktion

Die Michaelis-Konstanten für 1,3-Bisphosphoglycerat (1,3-BPG) und ADP wurden durch die Hinreaktion mit vorgeschalteter Indikatorreaktion ermittelt (Bücher, 1947). Durchführung und Testzusammensetzung zeigt folgende Aufstellung:

500 µl 50 mM Imidazol, pH 7.2

2.5 mM K_2HPO_4

5.0 mM MgCl_2

mit GAP (Aldehydform): Küvettenkonzentration 0.7 mM

oder ADP (freie Säure): Küvettenkonzentration 0.25 mM

20 µl 17 mM NAD^+ in H_2O

20 µl ADP (Küvettenkonzentration: 0.01-0.3 mM)

oder GAP (Küvettenkonzentration: 0.02-0.8 mM)

5 min, 25°C $\longrightarrow E_0$

10 µl GAPDH, 5 mg/ml, 400 U/ml

10 min, 25°C $\longrightarrow E_{\text{GAPDH}}$

20 µl PGK in TRA/DTE/BSA (Küvettenkonzentration: 4 mU/ml)

25°C, Kinetik $\longrightarrow E_t$

10 µl Hefe-PGK, 5 mg/ml, 2500 U/ml

1 h, 25°C $\longrightarrow E_\infty$

Die Berechnungen des zu verschiedenen Zeiten umgesetzten 1,3-Bisphosphoglycerats und der zugehörigen Anfangsgeschwindigkeiten für verschiedene Substratkonzentrationen wurden mit einem nach Bücher (1947) erstellten Rechenprogramm durchgeführt.

2.6 IMMUNISIERUNG

2.6.1 Aktive Immunisierung für die Fertilitätsuntersuchung

Gereinigte PGK-2 oder PGK-1 in PBS wurden mit den gleichen Volumen an komplettem Freundschens Adjuvans in der Spritze auf einem Vortex 20 min emulgiert und geschlechtsreifen C3H- und NMRI-Mäusen intramuskulär injiziert. Jedem Tier wurden dabei in jeweils 50 µl 50-100 µg PGK verabreicht. Nach vier bis sechs Wochen erhielten die Tiere eine zweite, intraperitoneale Injektion von 100-200 µg derselben PGK in 0.2 ml PBS. Zehn Tage später wurden die Mäuse mit nicht immunisierten Tieren des gleichen Stammes für 2-3 Wochen verpaart. Als Kontrolle dienten die Mäuse des entsprechenden Stammes aus der laboreigenen Kolonie.

2.6.2 Herstellung polyklonaler Antikörper (Tung, 1983)

10-12 Wochen alte, weibliche Balb/c-Mäuse wurden insgesamt fünfmal, alle sieben Tage, mit jeweils 40-50 µg gereinigter PGK in 0.2 ml Volumen i.m. geimpft. Dazu wurde das in PBS gelöste Antigen im Verhältnis 1:9 in komplettem Freundschens Adjuvans emulgiert. Nach weiteren sieben Tagen erhielten die Tiere i.p. eine letzte Injektion von 0.5 ml Pristan (2,4,10,14-Tetramethyl-Pentadecan).

2.6.3 Produktion monoklonaler Antikörper

Die Antigenmenge für die erste, intramuskuläre Injektion betrug pro Balb/c-Maus 10-50 µg gereinigte PGK-2 in 0.1 ml, im Verhältnis 1:1 in inkomplettem oder komplettem Freundschens Adjuvans emulgiert. Bei der zweiten, intraperitonealen Injektion vier Wochen später wurden pro Maus 40-90 µg PGK-2 in 0.2 ml PBS verabreicht. Drei Tage nach der Booster-Injektion wurde die Maus mit dem laut ELISA besten Titer mit CO₂ getötet und die Milz für die Fusion mit Myelomazellen entnommen.

2.7 PROTEIN A - SEPHAROSE CHROMATOGRAPHIE

(Seppälä et al., 1981; Mishell und Shiigi, 1980)

In gequollenem Zustand ergaben 1.5 g Protein A-Sepharose CL-4B ca. 5 ml Gel, das in eine Säule von 10 mm Durchmesser gefüllt wurde. Die Gelbetthöhe betrug 6.5 cm. Das Gel wurde mit dem pH 8.6 Puffer äquilibriert, dem bei Aufbewahrung des Gels zwischen den Chromatographien

puffer für 30 min bei 37°C diente zur Blockierung eventuell noch freier unspezifischer Bindungsstellen. Nach dreimaligem Waschen wurden die Antikörperproben eingefüllt und ebenfalls 3 h bei 37°C inkubiert. Bei quantitativen Bestimmungen diente Maus-IgG in verschiedenen Konzentrationen als Standard. Die Platte wurde wiederum dreimal gewaschen und das anti-Maus-IgG / AP - Konjugat, verdünnt in PBS/Tween, 15-16 h bei 4°C inkubiert. Nach einem weiteren gründlichen Waschvorgang wurden pro Vertiefung 0.2 ml Substratlösung eingefüllt, die Reaktion nach 30 min bei 37°C mit je 50 µl NaOH gestoppt und die Gelbfärbung durch Absorptionsmessung bei 405 nm in einem Photometer mit automatischem Platten-vorschub (institutseigene Anfertigung) bestimmt.

2.9 HYBRIDOMA-HERSTELLUNG (Kennett, 1979)

2.9.1 Fusion

Verwendet wurden 8-Azaguanin ($2 \times 10^{-5} \text{ M}$)-resistente Myelomazellen der Linie X63-Ag8.653 (Kearney et al., 1978), die uns ursprünglich freundlicherweise von Prof. K. Rajewsky (Institut für Genetik, Universität Köln) überlassen worden waren. Die Milzzellen einer gegen PGK-2 immunisierten Balb/c-Maus und die in exponentieller Wachstumsphase befindlichen, mit RPMI 1640 gewaschenen Myelomazellen wurden in serumfreiem RPMI 1640 im Verhältnis 10:1 gemischt und sofort zentrifugiert (250 g, 10 min, RT). Dem aufgelockerten Pellet wurden 0.5 ml 37°C-warmes, 50%iges Polyäthylenglycol 1000 (PEG; Baker) tropfenweise zugegeben. In insgesamt 8 min wurde die Mischung bei 37°C inkubiert und 3-5 min bei 400 g, RT zentrifugiert. Zur Verdünnung des PEG wurden 2 x 5 ml serumfreies RPMI 1640 über 3 min zugetropft, die Mischung nach weiteren 2-3 min vorsichtig zwei- bis dreimal mit einer 10ml-Pipette suspendiert und 10 min bei 200 g, RT zentrifugiert. Die Zellen wurden schließlich vorsichtig in 50 oder 80 ml HAT-Medium suspendiert und in vier oder acht am Tag vorher mit Milzmacrophagen versehenen Kulturplatten à 24 oder 96 Vertiefungen verteilt.

2.9.2 Kultivierung

Die Zellen wurden nach der Fusion 10-14 Tage mit HAT-Medium, dann zweimal mit HT-Medium und weiterhin mit HY-Medium gefüttert. Späte-

stens nach drei Wochen konnten die Kulturüberstände mittels ELISA auf das Vorhandensein von anti-PGK Antikörpern getestet werden.

Positive Kolonien wurden kloniert und zur Vermehrung in Kulturgefäße mit immer größerer Wachstumsfläche übertragen oder in Flüssigstickstoff eingefroren.

2.9.3 Klonierung

Die Klonierung erfolgte nach der "Limiting-Dilution"-Methode. Die Zellen wurden auf 10, 5, 2.5 und 1.25 Zellen pro ml Medium verdünnt und in Kulturplatten à 96 Vertiefungen verteilt (0.1 ml/Vertiefung). Das Wachstum wurde mit einem Umkehrmikroskop (Leitz Diavert; Leitz, Wetzlar) alle drei Tage kontrolliert und die Überstände einzelner Kolonien mit ELISA getestet.

2.9.4 Ascitesproduktion

10-12 Wochen alten Balb/c-Weibchen wurden zunächst i.p. 0.5 ml Pristan gespritzt und zehn Tage später 2×10^6 bis 5×10^7 Hybridomazellen in 0.5 ml sterilem PBS. Die im Ascites enthaltenen Hybridomazellen wurden gelegentlich wieder in Kultur genommen und dann eingefroren.

Zur Ascitesabnahme wurde die jeweilige Maus mit Äther betäubt und eine 18G-Kanüle in die Bauchhöhle gestochen, so daß der Ascites in ein eisgekühltes, steriles Zentrifugenglas fließen konnte. Polyklonaler oder monoklonaler Ascites wurde 30 min bei 10 000 g, 2-4°C abzentrifugiert, der Überstand möglichst ohne Fett abpipettiert und zunächst bei -20°C eingefroren.

Gelegentlich in störendem Ausmaß vorhandenes Fibrinogen wurde entfernt durch Ansäuern mit kalter 5N HCl bis pH 5, 1 h Rühren (0°C), 30 min Zentrifugation bei 10 000 g (2-4°C) und Neutralisation des Überstands mit kalter 5N NaOH bis pH 7.2.

2.10 AMMONIUMSULFATFÄLLUNG

Die in Ascites oder in Hybridoma-Kulturüberständen enthaltenen Immunglobuline wurden durch Dialyse in $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 50% Endkonzentration, ausgefällt und zweimal mit frischer, neutralisierter, 50% Ammoniumsulfat-Lösung gewaschen (43 500 g, 10 min). Das Pellet wurde in möglichst wenig Tris- oder Borat-Saline aufgenommen und über Nacht gegen den gewünschten Puffer dialysiert.

2.11 PROTEINBESTIMMUNG

Die Extinktionsmessung erfolgte mit einem Lichtweg von 1 cm bei 280 nm, wobei die Extinktion bei 360 nm automatisch abgezogen wurde (Sigma-ZWS 11 Spektralphotometer). Die Berechnung der Konzentration wurde mit den folgenden Umrechnungsfaktoren durchgeführt:

$$\text{Immunglobuline: } E_{280}/1.25 = \text{mg Protein/ml}$$

$$E_{280}/1.4 = \text{mg IgG/ml}$$

$$\text{PGK: } E_{280} \times 1.43 = \text{mg PGK/ml}$$

(PGK-1B aus Maus-Skelettmuskel)

Diese Umrechnungsfaktoren wurden durch einen Vergleich mit der Biuret-Methode nach Beisenherz (1953) und der Lowry-Methode nach Bensadoun und Weinstein (1976) bestätigt.

2.12 IMMUNDOPPELDIFFUSION (Ouchterlony, 1978)

Mit 0.5% Agarose vorbeschichtete Objektträger wurden mit 3 ml 1% Agarose in PBS, pH 7.2, 0.02% NaN_3 versehen. Die mit einem Stempel ausgestanzten Löcher besaßen folgende Maße: Zentralloch 6 mm $\varnothing$, äußere Löcher 2 mm $\varnothing$ im Abstand von je 7.5 mm zum Zentrum und zueinander. Als Standard diente das auch bei ELISAs verwendete Maus-IgG. Nach 24 h bei 37°C wurden die Gele zwei Tage in PBS und 2 h in H_2O ausgewaschen, getrocknet, mit Coomassie Brilliant Blue in Methanol/Eisessig/ H_2O (4.5:1:4.5) angefärbt und mit dem gleichen Lösungsmittelgemisch entfärbt.

Zur Isotypenanalyse wurden subklassenspezifische anti-Maus-IgG Antisera (Bionetics; über Fresenius, Oberursel) eingesetzt.

2.13 IMMUNFLUORESZENZ

2.13.1 Spermien

Alle Puffer wurden nach ihrer Herstellung mit 0.05% NaN_3 versehen und durch 0,2 μm -Filter (Millipore, Neu-Isenburg) filtriert. Die gewaschenen Spermatozoen wurden mit Tris-Saline, 0.05% Nonidet P-40 (NP40), 2 mM DTE auf eine Konzentration von 10^6 Spermien/ml eingestellt und 30 min bei RT unter mikroskopischer Kontrolle inkubiert. Nach vorsichtiger Durchmischung wurden Tropfen der Suspension auf Teflon-beschich-

teten Multitest-Objektträgern (Flow, Meckenheim) mindestens 60 min luftgetrocknet, und die Präparate bis zur Färbung bei -20°C aufbewahrt.

Für die indirekte Sandwich-Immunfluoreszenz wurden die Objektträger 20 min bei RT in Tris-Saline getaucht, die Spermienareale sodann 60 min bei RT mit je einem Tropfen Antikörperprobe in einer feuchten Kammer inkubiert. Das Waschen erfolgte je 10 min in Tris-Saline + 5% FCS, Tris-Saline + 0.05% NP40, Tris-Saline + 5% FCS. Mit Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) konjugierte Ziegenantikörper gegen Maus-IgG wurden 1:25 mit Tris-Saline + 5% FCS verdünnt und im Dunkeln ebenfalls 60 min bei RT auf den Spermien inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger wie oben gewaschen, 10 sec in Eriochromschwarz T (1:30 in H_2O) und 10 min in PBS getaucht und mit Glycerin, 9:1 in PBS, pH 8.0 eingebettet.

Die Beobachtung der Fluoreszenz erfolgte mit einem Orthoplan-Mikroskop mit Ploemopak 2-Auflichtfluoreszenz-Illuminator und eingebauter Orthomat W-Kamera (Leitz, Wetzlar). Photographiert wurde mit einem 27 DIN Kodak-TriX-Pan Film.

2.13.2 Hodenschnitte

Mäusehoden wurden über Nacht in Bouin-Lösung fixiert und nach Entwässerung in Paraffin eingebettet. 5-7 μm Schnitte wurden auf Objektträger aufgezogen und entparaffiniert. Nach Rehydrierung und Äquilibration in Tris-Saline + 5% FCS wurden die Schnitte in einer feuchten Kammer mit Antikörperproben und FITC-anti-Maus-IgG wie oben beschrieben inkubiert.

Nach der Dokumentation mittels Photographie wurden die Deckgläser entfernt und die Schnitte mit Hämatoxylin und Eosin angefärbt.

2.14 FIBROBLASTENKULTUR

2.14.1 Primärkultur

Bei der Milzpräparation sedimentierte Gewebestücke wurden in 4 ml Fibroblastenmedium suspendiert und auf zwei Petrischalen mit 60 mm Durchmesser (21 cm^2) verteilt. Nach 4 Tagen wurden weitere 2 ml Medium pro Schale zugesetzt. Die Fütterung mit frischem Medium erfolgte alle 2-3 Tage, wobei das Wachstum mikroskopisch kontrolliert wurde. Die Zellen wurden über kleine Kulturflaschen (25 cm^2) bis zum 75 cm^2 -Flaschenstadium mit 10 ml Kulturmedium expandiert.

2.14.2 Trypsinierung

Für eine vollständige Ablösung (mikroskopische Kontrolle) wurden konfluente Zellen mit 10 ml PBS-d gespült und 5 min bei 37°C mit 0.05 % Trypsin in PBS inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden nach Zugabe von 5 ml Kulturmedium suspendiert und 5 min bei 400 g abzentrifugiert. Ein Aliquot der wieder in Kulturmedium suspendierten und in einer Neubauer-Zählkammer gezählten Zellen wurde erneut in Kultur genommen, die restlichen Zellen für die PGK-Elektrophorese weiterbehandelt.

2.14.3 Berechnung der Vermehrungsrate

Die Anzahl der Populationsverdopplungen (PD) läßt sich bei der Subkultivierung a) aus der Aufteilung (split ratio) und Wachstumsfläche und b) aus der Zellzahl bei Aussaat und Ernte abschätzen:

a) zum Beispiel	split ratio	PD
	1:2	1.00
	1:3	1.50
	1:4	2.00
	1:5	2.25
	1:7	2.75

b) $PD = 3.3219 (\log E - \log A)$ wobei E = geerntete Zellzahl
A = ausgesäte Zellzahl

$$r = PD / (t_E - t_A) = \text{Multiplikationsrate}$$

wobei $t_E - t_A$ = Zeit zwischen Aussaat
und Ernte (Std. oder Tage)

$$g = 1 / r = \text{Verdopplungszeit (Std. oder Tage pro PD)}$$

2.14.4 Vorbereitung der Zellen für die PGK-Elektrophorese

Die mit PBS-d gewaschenen Fibroblasten wurden abzentrifugiert, in 100 µl 0.1 M Triäthanolamin (TRA), pH 7.6, 0.1% Saponin aufgenommen und 20 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 100 µl 25 mM TRA, pH 7.6, 1 mM DTE, sowie 0.025% BSA, 50% Glycerin zur Stabilisierung, und Zentrifugation (10 min, 29 000 g) wurde der Überstand der lysierten Zellen bis zur Elektrophorese bei -20°C eingefroren.

2.14.5 Karyogramme (Worton und Duff, 1979)

Noch nicht konfluente Flaschen wurden mit je 0.2 ml Colcemid (10 µg/ml) versehen. Nach 2 h im Brutschrank wurden die Zellen trypsiniert, in PBS-d gewaschen und mit 5 ml 0.56% KCl 20 min bei 37°C inkubiert. Die mit kaltem Methanol/Eisessig (3:1) fixierten Fibroblasten wurden auf angewärmte Objektträger getropft und Metaphaseplatten zur Chromosomenzählung photographiert.

3. E R G E B N I S S E

3.1 PGK-2: BIOCHEMISCHE UND KATALYTISCHE EIGENSCHAFTEN

3.1.1 Abhängigkeit der Aktivität von der Ionenkonzentration

Der Standardaktivitätstest wurde zur Ermittlung der optimalen Ionenstärke mit steigenden Konzentrationen NaCl durchgeführt. PGK-1B, -2A und -2B zeigen größte Aktivität im Bereich 50–150 mM NaCl.

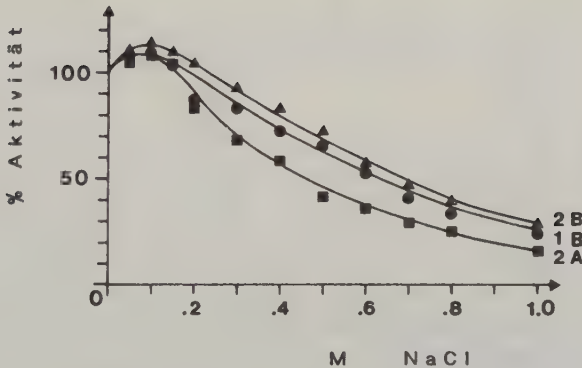
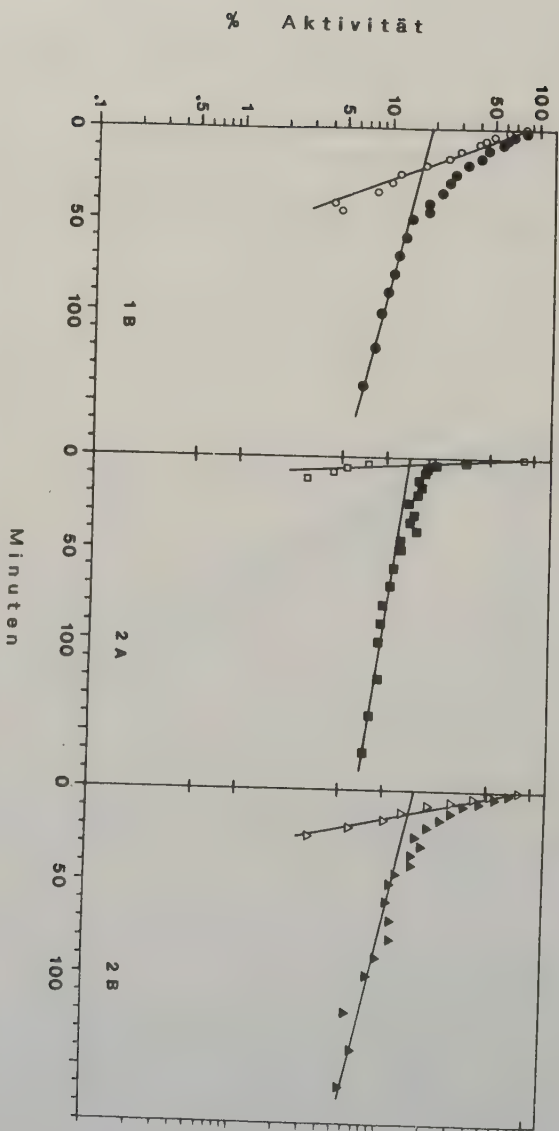


Abb.1: Abhängigkeit der PGK-Aktivität von der NaCl-Konzentration im Puffer

3.1.2 Temperaturstabilität

Für die Untersuchung der Hitzestabilität wurde die PGK-Aktivität bei 49°C zu verschiedenen Zeiten im Standardtest bestimmt, wobei die Aktivität bei 25°C gleich 100 % gesetzt wurde. Das Enzym war vorher mit 2 mM DTE 6 h bei 4°C reaktiviert worden und wurde durch 0.05% BSA im Testansatz stabilisiert. Ohne Albuminzusatz erwiesen sich die PGK-Proben als wesentlich labiler (Tab.1). Bei der graphischen Auftragung des Logarithmus' der Aktivität gegen die Inkubationszeit ergeben sich biphasische Kinetiken: eine zunächst rasche Aktivitätsverminderung geht in einen lang-

Abb. 2: Abhängigkeit der PGK-Aktivität von der Inkubationsdauer bei 49°C.
 ○ □ △ 1. Kinetik; ● ■ ▲ 2. Kinetik;



sameren, linearen Aktivitätsabfall über.

Durch Extrapolation der linearen 2. Kinetik und Berechnung der Differenz zu den Anfangswerten ergibt sich auch für die 1. Kinetik eine Gerade (Abb.2).

Die Halbwertszeit in Minuten wird berechnet aus:

$$k = \frac{1}{t} \ln \frac{c_0}{c_1} \qquad t_{1/2} = \frac{0.69}{k}$$

wobei c_0 und c_1 Werte der Kinetik mit dem Zeitintervall t darstellen.

Tab. 1: Halbwertszeiten in Minuten bei 49°C

	PGK-1B	PGK-2A	PGK-2B
a) 100% Aktivität	10 U/ml	11 U/ml	9 U/ml
1. Kinetik	9.2	1.5	5.2
2. Kinetik	97	172	107
b) 100% Aktivität	6 U/ml	6 U/ml	6 U/ml
1. Kinetik	4.4	na	5.1
2. Kinetik	20	24	28

na = nicht auswertbar infolge sehr schneller Inaktivierung auf 1 % der Anfangsaktivität; a) mit und b) ohne BSA-Stabilisierung;

Im Vergleich zu PGK-1B ist PGK-2B gleich oder geringfügig weniger stabil, PGK-2A deutlich labiler. Die restliche Aktivität von PGK-2A (2. Kinetik) weist dagegen eine höhere Halbwertszeit auf als bei PGK-1B und -2B.

3.1.3 Titration der Sulfhydrylgruppen

Reduzierte Sulfhydrylgruppen spalten Dithio-bis-nitrobenzoat (DTNB) zu Thionitrobenzoat mit einem Absorptionsmaximum bei 412 nm (Ellman, 1959) und $\epsilon = 13.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Das Plateau der Kinetik ist somit ein Maß für die erreichbaren SH-Gruppen eines Moleküls. Durch Zugabe von SDS wird das Molekül entfaltet, so daß auch innere SH-Gruppen zugänglich werden und die Reaktion beschleunigt abläuft. Der Testansatz bestand aus 1.0 ml PGK bekannter spezifischer Aktivität in 0.1 M Tris, pH 8.0, 20 µl

12 mg/ml DTNB, sowie 20 µl 10% SDS bei 25°C. Das zur Reaktivierung des Enzyms nötige DTE wurde durch Dialyse entfernt. Die Werte der Tab.2 wurden in einem Parallelansatz mit PGK vergleichbarer spezifischer Aktivität erhalten und legen eine gleiche Anzahl SH-Gruppen für jeden PGK-Typ nahe. Im Gegensatz zu PGK-1B und -2B verlangsamte sich die DTNB-Reaktion mit nativer PGK-2A nicht, die Extinktion bei 412 nm stieg weiter steil an. Möglicherweise liegt hier eine unterschiedliche Konformation des PGK-2A-Moleküls vor, jedoch kann eine teilweise Entfaltung bereits zu Beginn des Tests nicht ausgeschlossen werden. In der Literatur (Krietsch und Bücher, 1970; Mühlbacher, 1980) werden für Skelettmuskel aus Kaninchen und Maus zwei "langsam" reagierende und insgesamt sieben SH-Gruppen beschrieben. Das Ergebnis hängt von der eingesetzten spezifischen Aktivität, also dem Reaktivierungsgrad ab; ein weiterer Versuch mit 536 U/mg PGK-1B führte zu dem erwarteten Ergebnis von 1.82, bzw. 6.63 Mol SH-Gruppen pro Mol PGK.

Tab. 2: Mol SH-Gruppen pro Mol PGK

PGK im Testansatz	PGK-1B	PGK-2A	PGK-2B
	254 U/mg	259 U/mg	249 U/mg
nativ	1.47	1.72	1.68
denaturiert	4.88	4.56	5.18

3.1.4 Nucleotidspezifität

Der jeweils zu messende Phosphatdonator wurde in einer Sättigungskonzentration von 3.2 mM an Stelle von ATP im Standardaktivitätstest eingesetzt. Die resultierenden Reaktionsgeschwindigkeiten sind in Tab. 3 als Prozent Aktivität im Vergleich zu ATP mit 100 % angegeben. Alle vier untersuchten PGK-Formen verwenden spezifisch Purinnucleotide als Cosubstrat. PGK-2 scheint im Gegensatz zu PGK-1 eine etwas höhere Spezifität für GTP als für ITP zu besitzen. Desoxy-Purinnucleotide und UTP werden von PGK-2 in noch geringerem Ausmaß gespalten als von PGK-1.

Tab. 3: PGK-Aktivität (Prozent) in Anwesenheit verschiedener Phosphat-Donatoren bei der Rückreaktion

	PGK-1A°	PGK-1B°	PGK-2A°	PGK-2B°	Hefe-PGK°
ATP	100	100	100	100	100
ITP	47	54	33	42	53
GTP	43	44 ⁺	56	64	50
dGTP	14	25	7	9	29
dATP	12	12 ⁺	4	6	13
UTP	7	6	4	7	-
dITP	3	5 ⁺	1	1	7
dUTP	0	0	0	0	-
CTP	0	0	0	0	-
dCTP	0	0	0	0	-
dTTP	0	0	0	0	-

Angegeben sind Mittelwerte aus 1 (o), 2 (°) oder 3 (+) Doppelbestimmungen mit PGK aus Mäushoden.

3.1.5 Michaelis-Menten-Konstanten

Die Ermittlung der scheinbaren Michaeliskonstanten für 3-Phosphoglycerat (3-PG) und ATP-Mg erfolgte mit der Rückreaktion entsprechend dem Standardaktivitätstest. Die Hinreaktion diente zur K_m -Bestimmung für 1,3-Bisphosphoglycerat (1,3-BPG) und ADP-Mg. Die exakten Konzentrationen der eingesetzten Reaktionspartner wurden enzymatisch bestimmt und das jeweils zweite, nicht zu messende Substrat in sättigender Konzentration verwendet.

Bei der Bestimmung mit der Hinreaktion wird das von der PGK verbrauchte 1,3-BPG durch die Indikatorreaktion unter Bildung von NADH nachgeliefert, das gemessene NADH entspricht hier also nicht der Menge an gleichzeitig umgesetztem 1,3-BPG. Über die Gleichgewichtskonstante der Indikatorreaktion läßt sich die in der Testlösung zum Zeitpunkt t tatsächlich vorhandene 1,3-BPG-Menge berechnen. Da bei der GAPDH-Reaktion gleiche Mengen an NADH und 1,3-BPG entstehen, gilt für das gleichzeitig von der PGK umgesetzte 1,3-BPG:

$$- \underset{\text{umgesetzt}}{\Delta [1,3\text{-BPG}]_t} = \underset{\text{gemessen}}{[\text{NADH}]_t} - \underset{\text{vorhanden}}{[1,3\text{-BPG}]_t}$$

Aus den mit unterschiedlichen Substratkonzentrationen zu verschiedenen Zeiten gemessenen Extinktionen wurden die zugehörigen Anfangsgeschwin-

digkeiten errechnet, gemittelt und im Lineweaver/Burck-Diagramm ausgewertet.

Tab. 4: Michaeliskonstanten (mM) von PGK-1B, -2A und -2B

Substrat	mM	PGK-1B	PGK-2A	PGK-2B
3-PG	0.5-4.0	0.53	0.69	0.40
	4.0-15.0	3.1	1.7	1.8 *
ATP-Mg	0.07-3.3	0.31	0.49	0.36 *
1,3-BPG	0.02-0.8	0.0028	0.0041	0.0040
ADP-Mg	0.01-0.3	0.176	0.409	0.389

Angegeben sind die Mittelwerte von je 2 oder 1 (*) Doppelbestimmungen.

Bei der graphischen Auftragung von $1/v_0$ gegen $1/S$ lassen sich bei der Rückreaktion mit 3-PG für Bereiche hoher (4-15 mM) und niedriger (0.5-4.0 mM) Substratkonzentration zwei K_m -Werte extrapolieren (Abb. 3). Für die Messungen mit ATP, ADP und 1,3-BPG wurden nur niedrige, physiologisch wahrscheinlichere Substratkonzentrationen eingesetzt.

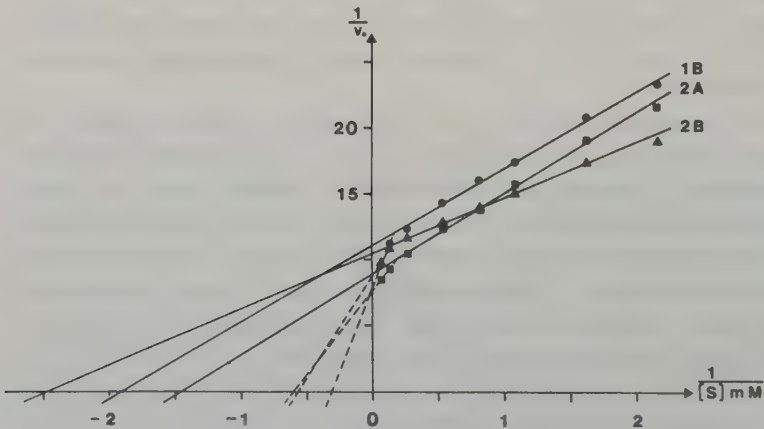


Abb. 3: Bestimmung der Michaeliskonstante für 3-PG im Lineweaver-Burck-Diagramm. Die aufgetragenen PGK-Aktivitäten gelten bezüglich der PGK-Konzentrationen in der Testküvette.

$$v_0 = \text{U/ml}$$

3.1.6 Hemmung mit Adipoyldihydrazo-ATP

Das Substratanalog Adipoyldihydrazo-ATP wirkt als kompetitiver Inhibitor (Kuntz et al., 1978). Zur Bestimmung der Inhibitorkonstante K_i wurde im Testgemisch des Standardaktivitätstests 0-1.0 mM Inhibitor eingesetzt und die PGK-Aktivität gemessen. Die quantitative Bestimmung der Inhibitor-Stammlösung erfolgte spektrophotometrisch bei 260 nm ($\epsilon = 15 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), der Anteil an freiem ATP und die ATP-Konzentration im Testgemisch wurden enzymatisch bestimmt. Bei der Auftragung $1/v_o$ gegen $[I]$ (Dixon-Diagramm, Abb. 4) gilt:

$$\text{Schnittpunkt mit der Abszisse} = -\frac{K_i}{K_m} \left([\text{ATP}] + K_m \right) = -S_A$$

$$K_i = \frac{S_A \cdot K_m}{[\text{ATP}] + K_m} \quad \text{wobei } K_m = \text{Michaeliskonstante der eingesetzten PGK für ATP}$$

Die ermittelten Werte betragen für PGK-1B: $K_i = 0.026 \text{ mM}$

PGK-2A: $K_i = 0.033 \text{ mM}$

PGK-2B: $K_i = 0.028 \text{ mM}$

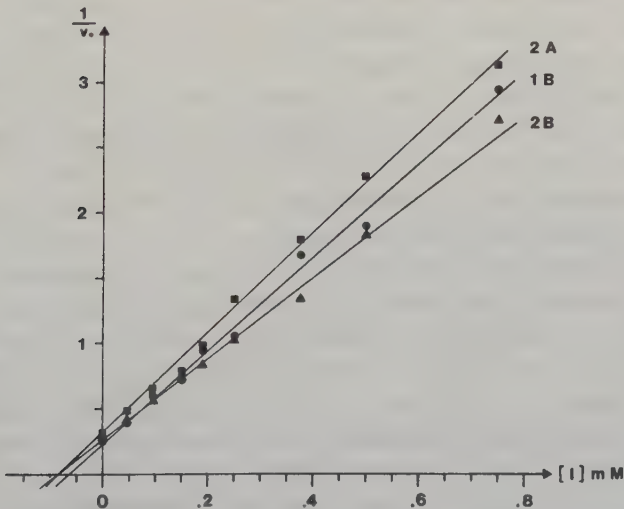


Abb. 4: Hemmung der PGK-Aktivität durch Adipoyldihydrazo-ATP. Die aufgetragenen Aktivitäten gelten bezüglich der PGK-Konzentrationen in den PGK-Ausgangslösungen.

$$v_o = \text{U/ml}$$

3.2 ELISA

3.2.1 Standardisierung

Die Bestimmung der Antikörpertiter von Plasma, Ascites oder Hybridoma-Kulturüberständen erfolgte mit dem Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (Engvall, 1980) nach dem Sandwich-Verfahren, d.h. eine Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen wurde mit Antigen (PGK) beschichtet, mit Antikörperproben beschickt und die Menge der gebundenen Antikörper mit an Alkalische Phosphatase gekoppelten anti-Maus-IgG (gegen ganzes Molekül) Antikörpern bestimmt. Jede Probe wurde gleichzeitig auf Reaktivität gegen PGK-1A, -1B, -2A und -2B geprüft.

Für die Beschichtung und die Probeninkubation erwiesen sich 3 h bei 37°C als optimal (Abb. 5a, 5b). Geringere Inkubationszeiten kamen nicht in Frage wegen der teilweise sehr geringen Antikörperkonzentrationen. Das Probevolumen von 0.2 ml wurde ebenfalls aus diesem Grunde gewählt, um auch geringere Antikörpermengen zu erfassen. Nur beim ersten Testen von Hybridomakulturüberständen aus 96-well Kulturplatten nach einer Fusion oder Klonierung erfolgten die Inkubationen mit 50 µl pro well.

Die optimale Inkubation des Enzym/Antikörper-Konjugats wird in der Literatur (Engvall und Perlmann, 1972) mit 8 h bei RT angegeben. Gute Ergebnisse wurden in der vorliegenden Arbeit mit 15–16 h bei 4°C erzielt (Abb. 5c). Als optimale Konjugatkonzentration galt die Verdünnung, die nach der Bindung an Maus-IgG und Reaktion mit NPP bei 405 nm eine Extinktion von 1.5 nicht überschritt. Neben selbst hergestellten Konjugaten wurde auch eines von Sigma verwendet. Der besseren Vergleichbarkeit wegen veranschaulichen möglichst viele der gezeigten Abbildungen ELISA-Bestimmungen mit diesem Konjugat.

Zur Beschichtung der Mikrotiterplatte wurde nach Vorversuchen mit Maus-IgG eine Antigenkonzentration von 2 µg/ml gewählt, da ab 1–2 µg/ml Beschichtung mit Maus-IgG die Bindungskurven in ein Plateau übergangen. Um noch freie unspezifische Bindungsstellen zu besetzen, wurde die Platte nach der Beschichtung 30 min bei 37°C mit 5% FCS im Beschichtungspuffer inkubiert und der jeweilige Puffer zum Waschen und zur Probenverdünnung mit 0.05% Tween 20 versetzt. Spätere Versuche ergaben für Beschichtung mit anti-Maus-IgG oder PGK eine Plateaukonzentration von 5–7 µg/ml (Abb. 5d), jede Konzentration darunter führte demnach zu einem meßbaren Ergebnis. Um nicht zu stark von den vorangegangenen Versuchsbedingungen abzuweichen, wurde die Beschichtungskonzentration

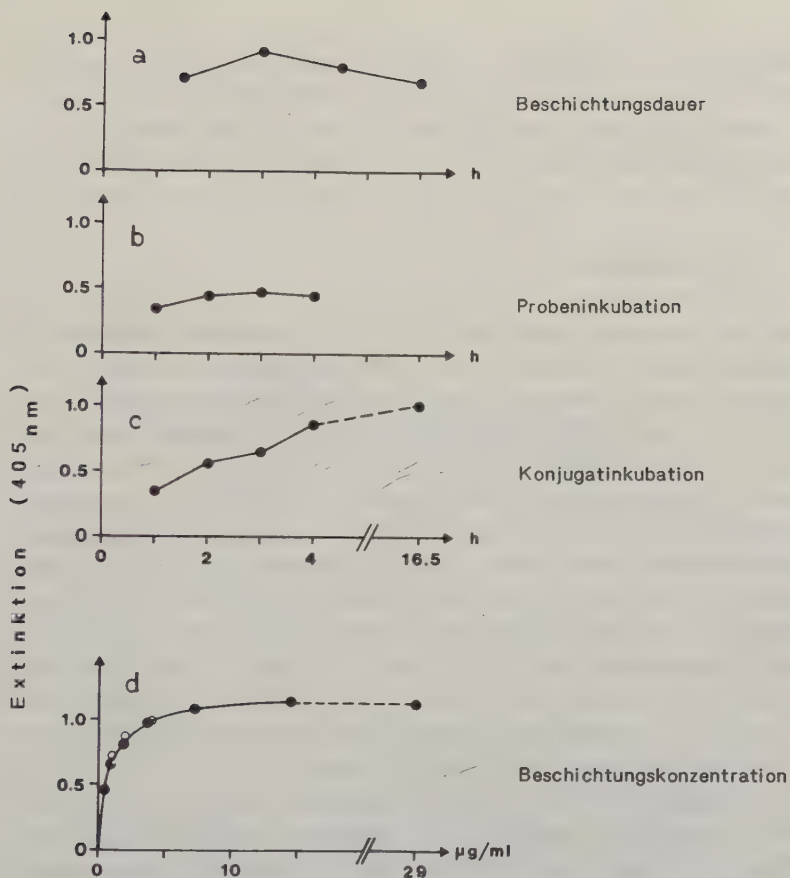


Abb. 5: Vorversuche zur Durchführung der ELISA-Bestimmungen:

- Unterschiedliche Beschichtungsdauer mit 950 ng/ml Maus-IgG bei 37°C, gefolgt von Inkubation mit Konjugat IV (3 h, 37°C).
- Unterschiedliche Probeninkubationsdauer (Maus-IgG) nach Beschichtung mit 2 µg/ml anti-Maus-IgG (3 h, 37°C) und gefolgt von Inkubation mit Konjugat IV (3 h, 37°C).
- Unterschiedliche Inkubationsdauer von Konjugat IV nach Beschichtung mit 2 µg/ml anti-Maus-IgG (3 h, 37°C) und Inkubation mit Maus-IgG (3 h, 37°C).
- Unterschiedliche Beschichtungskonzentrationen (µg/ml) von anti-Maus-IgG (o), bzw. PGK-2B (●), 3 h, 37°C, gefolgt von Inkubation mit 0.5 µg/ml Maus-IgG, bzw. 50 µg/ml IgG des anti-PGK-2 Ascites-pH 2,3-Pools (3 h, 37°C) und Sigma-Konjugat 1:6000 (15 h, 4°C).

von 2 µg/ml beibehalten. Die gemessene spezifische Antikörperreaktion konnte durch 4% PEG 6000 (w/v) in PBS/Tween nicht verstärkt werden.

Kulturüberstände von Macrophagen, HY-Medium, PBS/Tween, NaHCO_3 mit 5% FCS statt Antigen oder Plasma ungeimpfter Mäuse dienten als negative Kontrollen (siehe auch Abschnitt 3.4.1!).

3.2.2 Referenzkurven

Um die Antikörpertiter verschiedener Proben, deren Kreuzreaktivität und die Ergebnisse unterschiedlicher Konjugate miteinander vergleichen zu können, wurde für semiquantitative ELISA-Bestimmungen gleichzeitig mit Maus-IgG eine Referenzkurve erstellt, wobei die untere Nachweisgrenze bei 1–2 ng/ml lag, jedoch erst ab 5 ng/ml als verlässlich angesehen wurde. Wie aus Abb. 6a ersichtlich, führen Konzentrationen über 1 µg/ml Maus-IgG nicht zu einem wirklichen Plateau, sondern zu vermutlich unspezifischer Bindung. Von jeder Probe wurden daher mindestens drei Verdünnungen bestimmt. Bei linearer Auftragung der gemessenen E_{405} -Werte (Abszisse) gegen E_{405} -gemessen dividiert durch eingesetzte µg/ml Maus-IgG (Ordinate) ließ sich eine Regressionsgerade berechnen. Als Beispiel für eine solche Standardkurve wurden die Werte von acht an unterschiedlichen Tagen durchgeführten Bestimmungen zusammengefaßt (Abb. 6b). Die Streuung der Ausgleichsgeraden beträgt $\pm 6\%$. Für die Routine wurde jedoch auf eine lineare Transformation verzichtet.

Im folgenden wird die anti-PGK Reaktivität meist in "RK/ml" (Referenzkonzentration) angegeben. Dies entspricht derjenigen Menge an Maus-IgG in µg/ml, die unter den jeweils gegebenen Testbedingungen (unterschiedliche Konjugate!) zum gleichen Meßergebnis führen würde.

Laut Ouchterlony-Doppelimmundiffusion mit subklassenspezifischen Antisera (1:3) enthielt das Standard-Maus-IgG die Subklassen IgG1 und IgG2a, laut Bestimmung mit dem ELISA-Verfahren (Antisera 1:2000) alle vier Subklassen: IgG2a > IgG2b > IgG1 > IgG3. Alle vier Typen wurden von dem hierzu verwendeten Sigma-Konjugat erfaßt. Mit den subklassenspezifischen Antisera ergaben sich nach der oben angegebenen Umrechnung statt einer Geraden hyperbolische Kurven, die für multiple Bindung sprechen (Abb. 7). Die mit anti-Maus-IgG ermittelte Regressionsgerade (Abb. 6b) reicht über alle Subklassen hinweg (siehe auch Abschnitt 3.5.3!).

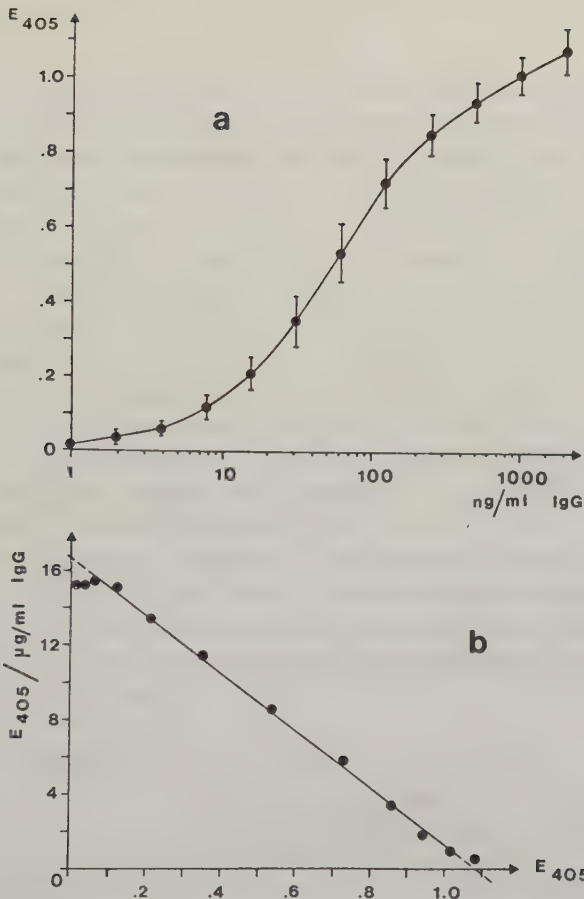


Abb. 6: Mittelwerte von acht ELISA-Bestimmungen mit Standard-Maus-IgG und Sigma-Konjugat (1:6000):
a) Referenzkurve
b) Regressionsgerade nach linearer Transformation

Es wird darauf hingewiesen, daß bei den Antikörperbestimmungen mit den Plasmaproben der für die Fertilitätstests geimpften Mäuse die Referenzkurven nach dem Schema Maus-IgG (Beschichtung) + Konjugat angefertigt wurden. Es ergaben sich hierbei höhere RK/ml-Werte als bei allen anderen ELISA-Messungen, bei denen zur Referenz in der Reihenfolge anti-Maus-IgG + Maus-IgG + Konjugat inkubiert wurde.

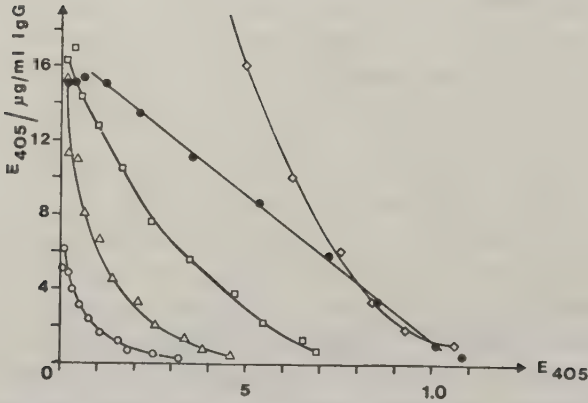


Abb. 7: Bestimmung der Subklassen des Standard-Maus-IgG mittels ELISA (Sigma-Konjugat 1:6000).

◇ IgG2a □ IgG2b △ IgG1 ○ IgG3

—●— Maus-IgG-Regressionsgerade von Abb. 6

3.3 FERTILITÄTSUNTERSUCHUNG

3.3.1 Immunantwort

Zwölf Wochen alte, weibliche und männliche C3H/Aa-Pgk-1^a-Mäuse wurden mit PGK-2A oder -2B geimpft und erhielten nach 4 Wochen eine 2. Injektion (Booster) mit einer Mischung aus PGK-2A und -2B. Die Verpaarung erfolgte 10 oder 14 Tage nach der Auffrischungsimpfung für 3 Wochen. Die erste Gruppe wurde 14 Wochen nach der Erstinjektion ein zweites Mal geboostert und 2 Tage später mit denselben Partnern erneut verpaart. Da sich keine Verminderung der Fertilität feststellen ließ, wurde der Versuch mit NMRI-PgK-1^b-Mäusen wiederholt, die eine hohe Wurfgröße aufweisen. Die NMRI-Tiere (♀ 21 Wochen, ♂ 9 Wochen alt) erhielten bei beiden Injektionen ein PGK-2A/2B-Gemisch.

Die höchsten Antikörperkonzentrationen traten ungefähr vier Wochen nach der ersten Injektion und ungefähr zwei Wochen nach der zweiten Injektion auf (Abb. 8, 9). Die Titer wurden aus den gemessenen ELISA

E_{405} -Werten von mindestens drei Plasmaverdünnungen anhand einer gleichzeitig erstellten Referenzkurve (Maus IgG + Konjugat) berechnet. Da dies nur eine semiquantitative Bestimmung darstellt, werden die Antikörperreaktivitäten statt in $\mu\text{g/ml}$ in "RK/ml" (Referenzkonzentration) angegeben (siehe auch Abschnitt 3.2.2!). Die individuelle Immunantwort variierte stark; die Werte (vgl. Tab. 6, 7!) reichten von 2-5 RK/ml Plasma wie in unbehandelten Mäusen bis zu 1000 RK/ml. C3H-Mäuse wiesen einen etwas niedrigeren Titer auf (bis 350 RK/ml) als NMRI-Mäuse (bis 1000 RK/ml). Die Kreuzreaktivität verdeutlicht Tab. 5 (siehe auch Abb. 11!).

Eine kleine Gruppe von C3H/HeH-Pgk-1^b-Mäusen (6-16 Wochen alt) wurde mit PGK-1A geimpft, nach drei Wochen geboostert und mit Pgk-1^a-Mäusen verpaart, um einen eventuellen Effekt zirkulierender Antikörper gegen somatische PGK auf die Fertilität zu untersuchen. Am 5.Tag nach der Auffrischung betrugen die Titerwerte 3 ± 1 RK/ml anti-PGK-1A Reaktivität ($n=6$). Einige C3H/Aa-Pgk-1^a Mäuse wurden mit PGK-1B geimpft, konnten jedoch infolge allgemeiner Züchtungsprobleme der gesamten Mausgeneration bei den Auswertungen nicht berücksichtigt werden. Ihre Titer lagen am 5.Tag nach dem Boostern bei 5 ± 0.5 RK/ml anti-PGK-1B Reaktivität.

Tab. 5: Kreuzreaktivität von Antikörpern gegen PGK-2

Maus	Tag	anti-PGK Reaktivität			
		1A	1B	2A	2B
NMRI Nr. 3	68	83	110	28	280
5	68	72	79	34	260
6	68	18	5	na	11
7	68	58	62	44	316
8	68	82	102	40	316
9	68	8	11	18	70
C3H/Aa ♀	64	-	-	320	155
♀	64	-	-	130	130
♂	64	-	-	49	32
♂	72	-	-	6	4

Die Werte der anti-PGK Reaktivität sind in RK/ml Plasma angegeben. Die Bestimmungen wurden mit Plasma durchgeführt, das am angeführten Tag nach der Erstimpfung mit PGK-2A/2B entnommen worden war (vgl. Abb. 8 und 9!).

na = nicht auswertbar, da Konzentration unter Nachweisgrenze

3.3.2 Fertilität

Die Geburten erfolgten 18-23 Tage nach dem ersten Tag der Verpaarung mit Ausnahme von einem C3H/HeH-Weibchen (nach 27 Tagen) und zwei NMRI-Weibchen (nach 28 und 30 Tagen). Immunisierung mit spermienspezifischer PGK-2 oder somatischer PGK-1 führte zu keiner signifikanten Reduktion der Fertilität im Vergleich zu unbehandelten Tieren. Das Geschlechterverhältnis kehrte sich bei mit PGK-2 geimpften NMRI-Mäusen um. Ganz offensichtlich liegt keine Korrelation zwischen Antikörpertiter und Wurfgröße vor (Tab. 6, 7 und 8). Diese Befunde gelten sowohl für Würfe von immunisierten Weibchen wie auch von geimpften Männchen. Die Fälle mit verminderter Wurfgröße wurden durch eine Kontrollverpaarung mit sicher fertilen Männchen überprüft und beruhten auf einer beeinträchtigten Fruchtbarkeit des unbehandelten Weibchens; sie wurden daher von der Auswertung ausgeschlossen (Partner von C3H/Aa Nr.13 und NMRI Nr.9).

Tab. 6: Würfe von C3H/Aa-Mäusen nach Impfung mit PGK-2

Weibchen				Männchen			
Maus Nr.	Würfe ♀	♂	RK anti-PGK-2 pro ml Plasma	Maus Nr.	Würfe ♀	♂	RK anti-PGK-2 pro ml Plasma
1a	4	1	30	9a	4	2	4
b	6	2	3.5	b	3	4	1.5
2a	2	4	6	10a	-	-	27
b	3	3	2.5	b	4	3	8
3a	insg.5		48	11a	5	1	95
b	2	6	5.5	b	4	5	64
4a	7	7	8	12a	4	4	480
b	5	5	2.5	b	3	4	94
5a	3	5	10	13a	(♀ unfruchtbar)		59
b	4	4	2	b			94
6	5	2	43	14a	3	4	-
7	2	5	54	15a	5	3	41
8	3	3	80	16a	4	6	-

Die Mäuse Nr. 1-5 und 9-13 wurden mit PGK-2A immunisiert und nach 4 und 14 Wochen mit PGK-2A/2B geboostert. Die Verpaarungen erfolgten 10 (a), bzw. 2 (b) Tage nach der Auffrischungsimpfung für jeweils drei Wochen. Die angegebenen Antikörperreaktivitäten gegen PGK-2A wurde in Plasma bestimmt, das am 7. (a), bzw. am 2. (b) Tag nach der Booster-Injektion entnommen worden war.

Die Mäuse Nr. 6-8 und 14-16 wurden mit PGK-2A/2B geimpft, nach 4 Wochen geboostert und nach weiteren 16 Tagen für drei Wochen verpaart. Die Antikörperreaktivitäten gegen PGK-2B wurden in Plasma vom 6. Tag nach der Booster-Injektion bestimmt.

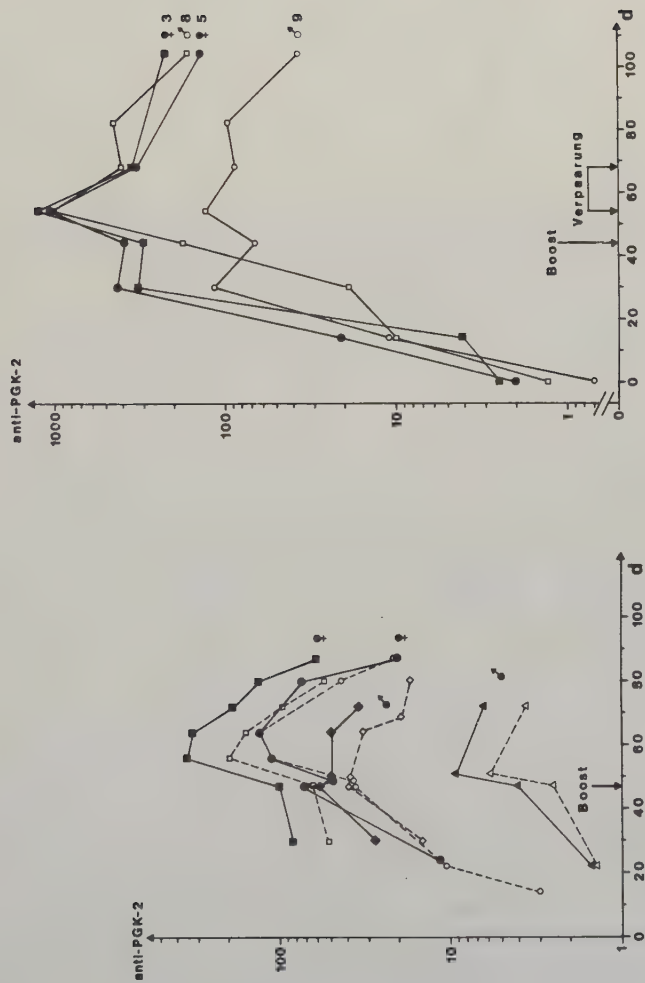


Abb. 9: Profil der Immunantwort von NMRI-Mäusen gegen PGK-2A/2B nach Impfung mit PGK-2A/2B.

Abb. 8: Vorversuch zur Ermittlung des Immunprofils nach Impfung von C3H/Aa-Mäusen mit PGK-2A/2B und Boostern mit PGK-2A.

— anti-PGK-2A Reaktivität (RK/ml Plasma)
 --- anti-PGK-2B Reaktivität (RK/ml Plasma)

Tab. 7: Würfe von NMRI-Mäusen nach Impfung mit PGK-2

Weibchen				Männchen			
Maus	Würfe		RK anti-PGK-2 pro ml Plasma	Maus	Würfe		RK anti-PGK-2 pro ml Plasma
Nr.	♀	♂		Nr.	♀	♂	
1	4	4	690 °	6	5	3	7.6 °
2	8	5	940 °	7	4	4	120 °
3	7	6	1260 °	8	7	1	1020 °
4	4	9	750 °	9	3	1	130 °
5	2	2	1060 °	10	6	5	377 +
plus 8 Aborte							

Die Mäuse wurden mit PGK-2A/2B immunisiert und nach 6 Wochen geboostert. Die in der Tabelle angegebenen Antikörperreaktivitäten gegen dieselbe PGK-Mischung wurden in Plasma bestimmt, das an folgenden Tagen entnommen worden war:

(o) 10 Tage nach Booster = Tag der Verpaarung, (*) 17 Tage nach Booster, (+) 24 Tage nach Booster = Trennungstag.

Abb. 9 zeigt das Profil der Immunantwort der Mäuse Nr. 3, 5, 8 und 9!

Tab. 8: Würfe von mit PGK geimpften Mäusen im Vergleich zu Würfen unbehandelter Mäuse

Verpaarungen		durchschnittl. Wurfgröße	%♀	%♂	Signifikanz der Wurfgrößen-Differenz (t-Test)
a)	immunisierter Mäuse				
b)	unbehandelter Mäuse				
<u>C3H/Aa</u>					
a)	imm.: 8♀, 7♂ (n=22)	7.2 ±0.3 SEM	50.6	49.4	0.2 > p > 0.1
b)	nicht imm. (n=75)	6.5 ±0.3 SEM	51.7	48.3	
<u>C3H/HeH -Pgk-1^b</u>					
a)	imm.: 2♀, 3♂ mit PGK-1A (n=5)	6.4 ±1.2 SEM	47.8	52.2	0.5 > p > 0.2
b)	nicht imm. (n=29)	5.5 ±1.1 SEM	47.8	52.2	
<u>NMRI</u>					
a)	imm.: 5♀, 4♂ (n=9)	10.7 ±0.8 SEM	55.4	44.6	0.5 > p > 0.2
b)	nicht imm. (n=33)	11.6 ±0.5 SEM	46.2	53.8	

3.4 POLYKLONALE ANTIKÖRPER

3.4.1 Ascites-Antikörper

Je drei elf Wochen alte Balb/c-Weibchen wurden nach dem Impfschema von Tung (1983) gegen PGK-2 immunisiert. Pro i.p. Injektion erhielt jedes Tier 36 µg PGK-2A, bzw. 50 µg PGK-2B in 0.2 ml PBS/Freund-schem Adjuvans (1:9). Die Impfung wurde alle sieben Tage, insgesamt fünfmal, wiederholt. Zur Förderung der Ascitesproduktion erhielten sie nach einer weiteren Woche i.p. 0.5 ml Pristan. Die jeweiligen Ascitesabnahmen wurden zusammengefaßt und ergaben 71 ml anti-PGK-2A Ascites, bzw. 54 ml anti-PGK-2B Ascites. Weitere, später abgenommene 17.5 ml einer gegen PGK-2B immunisierten Maus wurden gesondert aufbewahrt. Da die Antikörperreaktivitäten der mit 40% AS ausgefällten Proteine beider Gruppen keinerlei Unterschied bezüglich PGK-2 aufwiesen (Abb. 10), wurden beide Ascites vereinigt, gegen 35% AS dialysiert und über PAS wie in Abschnitt 2.7 beschrieben chromatographiert. Das mit pH 8.6 ausgewaschene Protein (206 mg) enthielt laut ELISA noch ca. 13 mg Maus-IgG (6.3%); rund 0.015% (anti-PGK-1) bis 0.04% (anti-PGK-2) des Proteins reagierten mit PGK. Das pH 2.3 Eluat enthielt 82 mg IgG (Messung bei 230 nm). Die ELISA-Bestimmung ergab ca. 63 mg Maus-IgG (86%); rund 0.3-1.0 % des Proteins reagierten mit PGK (Tab. 9). Die Kreuzreaktivität veranschaulicht Abb. 11. Laut Ouchterlony-Doppelimmundiffusion setzte sich das IgG des pH 2.3 Pools aus den Subklassen IgG3 > IgG2a, IgG2b > IgG1 zusammen, der pH 8.6 Pool enthielt ebenfalls noch alle vier IgG Subklassen, wenn auch in weitaus geringerer Menge.

Infolge der relativ hohen Antikörperkonzentration konnte eine Ouchterlony Doppelimmundiffusion mit PGK durchgeführt werden. Eine, wenn auch schwache, Präzipitatinie zwischen den wells wurde erzielt mit 5 µg/50 µl PGK-2A im zentralen Loch und 1.6 RK/20 µl anti-PGK-2A Reaktivität im äußeren Loch oder mit einer zentralen anti-PGK-2A Reaktivität von 4 RK/50 µl und 1 µg/5 µl PGK-2A außen. Da 50 µl des Ascites-Konzentrats (35% AS) 2 mg IgG enthielten, waren die nicht präzipitierenden Proteine sehr schlecht auszuwaschen. Eine anti-PGK Reaktivität von 0.04 RK/ml entspräche einer Extinktion (405 nm) von ca. 0.450 und damit 0.04 µg/ml spezifisch reagierendem Maus-IgG im ELISA der Abb. 10, der sich somit als 100mal empfindlicher erwies.

Mit dem pH 2.3 Pool des anti-PGK-2 Ascites wurde ferner eine sogenannte Schachbrett-Titration durchgeführt, um das ELISA-Testsystem

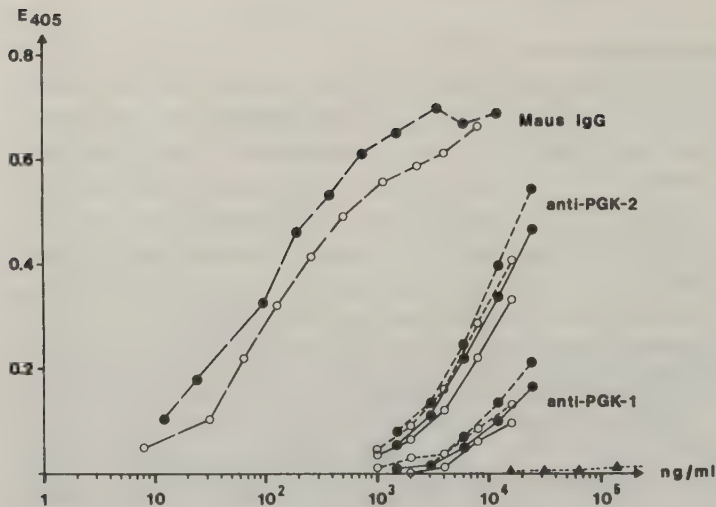


Abb. 10: ELISA der anti-PGK-2A und anti-PGK-2B Ascites.

Die Abbildung zeigt die Extinktionen bei 405 nm (Sigma-Konjugat) in Abhängigkeit von der eingesetzten Proteinkonzentration (ng/ml).

● anti-PGK-2A Ascites

○ anti-PGK-2B Ascites

— anti-PGK-1A und anti-PGK-2A Reaktivität

----- anti-PGK-1B und anti-PGK-2B Reaktivität

▲ anti-PGK Reaktivität von Plasma ungeimpfter Mäuse

zu überprüfen und um eine Titerbestimmung entsprechend folgender Definition zu erhalten: Titer ist gleich der Verdünnung, bei der die maximale Extinktion um die Hälfte reduziert ist. Ein Titer von mehr als 1:1000 gilt als gut, über 1:200 als annehmbar. Es zeigte sich, daß bei der Beschichtung erst PGK-Konzentrationen über 7 µg/ml zu maximalen, dann immer gleichen Extinktionswerten führen. Das heißt, alle Beschichtungen mit weniger als 7 µg/ml PGK führen zu meßbaren Ergebnissen.

Der ermittelte Antikörpertiter nach obiger Definition hängt von der zur Beschichtung eingesetzten Antigenkonzentration ab, d.h. je niedriger die Antigenmenge, desto niedriger wird der maximale E₄₀₅-Wert, der nur

durch die in Abschnitt 3.2.2 beschriebenen Umformung der sigmoiden Bindungskurve in eine Gerade zu erhalten ist. Bei maximaler Bindung wurde für $E_{\max}/2 = 0.7$ der Wert 1.6 µg/ml eingesetztes Ascites-IgG ermittelt, für die übliche Beschichtung mit 2 µg/ml PGK und $E_{\max}/2 = 0.5$ dagegen der Titer 1.25 µg/ml Ascites-IgG. Dies entspräche nach Umrechnung auf das Originalvolumen (angenommene PAS-Ausbeute 60%) einer Verdünnung von ca. 1:700, bzw. 1:900.

Tab. 9: Protein A-Sepharose Chromatographie mit anti-PGK-2 Ascites

	pH 8.6	pH 2.3
nach 50% AS-Fällung	206 mg Protein	82 mg IgG
ELISA: Maus-IgG	13 mg = 6.3%	63 mg = 77%
anti-PGK-1A	27µg = 0.013%	213µg = 0.26%
anti-PGK-1B	33µg = 0.016%	254µg = 0.31%
anti-PGK-2A	87µg = 0.042%	804µg = 0.98%
anti-PGK-2B	78µg = 0.038%	763µg = 0.93%
Ouchterlony	IgG 2a, 2b > 3 > 1	IgG 3 > 2a, 2b > 1

Protein A-Sepharose Chromatographie von Ascites aus gegen PGK-2 geimpften Balb/c-Mäusen und die im ELISA ermittelten anti-PGK Reaktivitäten. Die Konzentrationsangaben für die Antikörper können nur als semiquantitative Werte angesehen werden, wobei µg = RK (siehe Abschnitt 3.2.2 !).

3.4.2 anti-PGK-2 Plasma-Pool

Nach Beendigung der Fertilitätsuntersuchung wurden alle restlichen Plasmaproben zusammengefaßt (ca. 1.3 ml Originalvolumen). Das Präzipitat aus der Fällung mit 50% AS wurde mit 57% Ausbeute über PAS chromatographiert und die eluierten Proteine erneut ausgefällt. Hierbei wurden noch die von Ey et al. (1978) beschriebenen Puffer verwendet. Das von PAS gebundene (0.1 M Phosphat, pH 8.0) und mit pH 2.9 (0.1 M Essigsäure, 0.15 M NaCl) eluierte Protein wurde anschließend nochmals, mit 84.5% Ausbeute, chromatographiert und mit Puffer von unterschiedlichem pH (0.1 M Citrat, 0.1 M Na_2HPO_4) stufenweise eluiert. Der Hauptanteil an

IgG befand sich in den pH 2.9 und pH 4.5 Fraktionen; ein Teil der letzteren wurde verschüttet. Die Tab. 10 und 11 geben die zusammengefaßten Ergebnisse der Chromatographien und der semiquantitativen ELISA-Bestimmungen wieder.

Tab. 10: Erste Protein A-Sepharose Chromatographie des Plasma-Pools

	42 mg Protein über PAS	
	pH 8	pH 2.9
nach 50% AS-Fällung	13 mg Protein	11 mg IgG
ELISA: Maus-IgG	0.3 mg = 2.4%	0.2-0.7mg = 0.03%
anti-PGK-1A	1.7µg = 0.013%	3.3µg = 0.03%
anti-PGK-1B	2.4µg = 0.018%	4.4µg = 0.04%
anti-PGK-2A	5.6µg = 0.043%	11.0µg = 0.10%
anti-PGK-2B	3.8µg = 0.029%	8.3µg = 0.08%
Ouchterlony	schwach IgG1	IgG1 > IgG2

Erste Protein A-Sepharose Chromatographie von Plasma gegen PGK-2 geimpfter Mäuse und die im ELISA ermittelten anti-PGK Reaktivitäten. Die Konzentrationsangaben für die Antikörper können nur als semiquantitative Werte angesehen werden (vgl. Abschnitt 3.2.2 !)

Tab. 11: Zweite Protein A-Sepharose Chromatographie des Plasma-Pools

	10.4 mg IgG über PAS			
	pH 8	pH 6	pH4.5	pH 2.9
IgG nach 50% AS	0.61 mg	0.16 mg	2.26 mg	5.76 mg
ELISA: Maus-IgG	23µg = 3.9%	60µg = 37%	337µg = 15%	737µg = 13%
anti-PGK-1A	nm	0.3µg = 0.21%	nm	2.1µg = 0.036%
anti-PGK-1B	nm	0.9µg = 0.56%	0.14µg = 0.006%	2.8µg = 0.049%
anti-PGK-2A	0.2µg = 0.03%	2.4µg = 1.49%	0.3µg = 0.014%	6.9µg = 0.12%
anti-PGK-2B	nm	1.5µg = 0.94%	0.2µg = 0.01%	4.7µg = 0.081%
Ouchterlony	-	IgG1	IgG1, IgG2	IgG1, IgG2a, IgG2b

Zweite Protein A-Sepharose Chromatographie von Plasma gegen PGK-2 geimpfter Mäuse und die im ELISA ermittelten semiquantitativen anti-PGK Reaktivitäten. nm = nicht meßbar wegen zu geringen eingesetzten Konzentrationen.

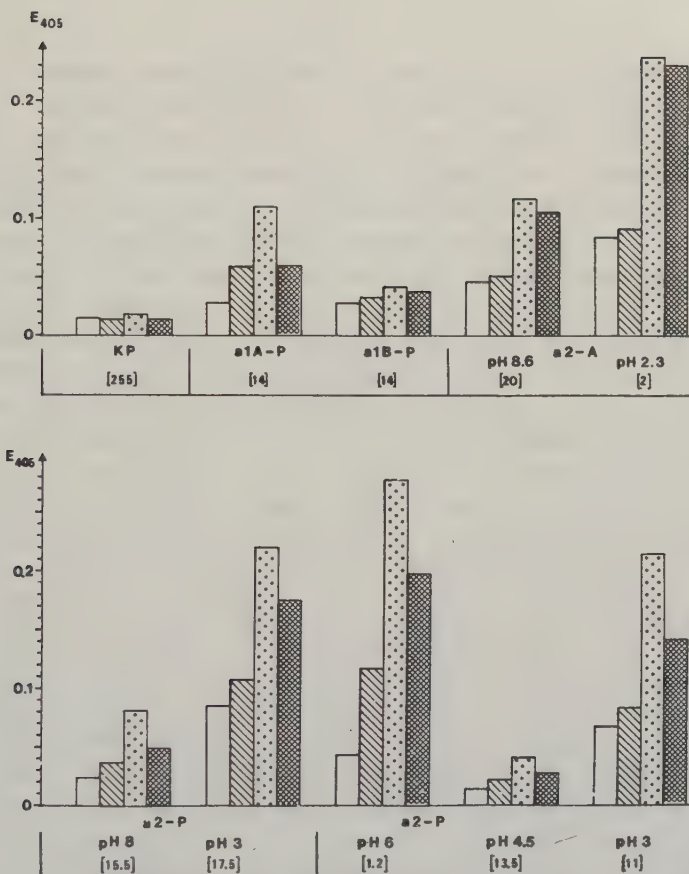


Abb. 11: Vergleich der anti PGK Reaktivität der polyklonalen Antikörper. Die Zahlen in eckigen Klammern geben die im ELISA eingesetzte Proteinmenge in µg/ml an, die zu der angegebenen Extinktion bei 405 nm führte (Sigma-Konjugat).

KP = Kontrollplasma ungeimpfter Mäuse

a1A-P = anti PGK-1A Plasma (pH 2.3 Pool nach PAS)

a1B-P = anti PGK-1B Plasma (pH 2.3 Pool nach PAS)

a2-P = anti PGK-2 Plasma nach der 1. und 2. PAS

a2-A = anti PGK-2 Ascites nach PAS

□ anti PGK-1A

▨ anti PGK-1B

▩ anti PGK-2A

▧ anti PGK-2B

Bei allen Eluaten stellten die mit PGK reagierenden Antikörper nur einen äußerst geringen Anteil am Gesamtprotein dar. Die mit PGK reagierenden Antikörper ließen sich nicht in einem einzigen pH-Pool erhalten, sondern nur in den pH 6 Fraktionen anreichern. Bei erneuter Ausfällung mit 50% AS, um die Proben für Fluoreszenzversuche zu konzentrieren, resultierte hier kein Präzipitat mehr, so daß dieses Eluat nicht weiter getestet werden konnte. In Abb. 11 werden die anti-PGK Reaktivitäten aller gewonnenen polyklonalen Antikörper miteinander verglichen. Das dort ebenfalls aufgeführte anti-PGK-1A und anti-PGK-1B Plasma stammt aus den in Abschnitt 3.3.1 beschriebenen Impfversuchen mit PGK-1. Auch hier sind die wenigen Antikörper kreuzreaktiv mit allen vier PGK-Typen.

3.5 MONOKLONALE ANTIKÖRPER

3.5.1 Fusion

Vor jeder Fusion wurden die HGPRT⁻ Myelomzellen mit 2×10^{-5} M 8-Azaguanin behandelt, um eventuell aufgetretene Revertanten auszuschließen. Insgesamt wurden sieben Fusionen durchgeführt (Tab. 12). Da die Maus-Myelomzellen X63-Ag8.653 keine eigenen Immunglobuline produzieren (Kearney et al., 1979), mußten die von den Hybridomazellen sezernierten Antikörper von den Milzlymphocyten der immunisierten Balb/c-Mäuse stammen. Zwar soll es gelegentlich auch in dieser Hinsicht Revertanten geben, dies wurde jedoch nicht überprüft.

In 20-100% der nach einer Fusion mit Zellen versehenen Zellkulturplatten-Vertiefungen (wells) zeigte sich je nach Anzahl dieser wells nach der HAT-Selektion (Littlefield, 1964) Wachstum. Immunglobulinfreies Pferdeserum erwies sich als unbrauchbar, da die fusionierten Zellen bei seiner Verwendung nicht überlebten. Sobald die Hybride mindestens 10% der Wachstumsfläche einnahmen, wurden je 50 µl ihres Kulturüberstands mittels des in Abschnitt 2.8.2 beschriebenen ELISAs qualitativ auf Reaktivität gegen PGK-1A, -1B, -2A und -2B getestet. Eine Kultur galt als wahrscheinlich positiv, wenn ihr Extinktionswert den Leerwert um mindestens 0.01 Einheiten überschritt. Dies entsprach ca. 3 SD Abweichung vom Mittelwert der Leerwerte. Von den wells mit wachsenden Hybridomakolonien zeigten 10-30% mit PGK-2 eine positive Reaktion. Hybride mit der geringsten Kreuzreaktivität wurden kloniert, die positivsten Klone vermehrt und erneut im ELISA überprüft, da sichere Aussagen über die anti-PGK Reaktivität ihrer Antikörper erst bei größerer Zelldichte und größeren Einsatzmengen an Kulturüberstand möglich waren. Die Zellkulturplatten mit 96, 24 oder 6 wells wurden fortlaufend nummeriert. Die Klone erhielten die Nummer der Platte, in der sie zuletzt vor dem Flaschenstadium kultiviert worden waren.

Mittels Poisson-Statistik läßt sich die spezifische Effizienz (SE) einer Fusion berechnen (Stähli et al., 1983), einige nicht bewachsene wells vorausgesetzt. Die Formel für die Wahrscheinlichkeit monoklonaler Kulturen unter den bewachsenen wells lautet (DeBlas et al., 1983):

$$P_1 = \frac{(1-u) [-\ln(1-u)]}{u} \quad \text{wobei } 0 \leq u < 1$$

u = Anzahl bewachsene wells / Anzahl plattierte wells

Für die Häufigkeiten P_2, P_3 , etc. von bewachsenen wells mit zwei, drei oder mehr Kolonien gilt entsprechend:

$$P_i = \frac{(1-u) [-\ln(1-u)]^i}{i! u} \quad \text{wobei } i = 2, 3, \text{ etc.}$$

Zur Ermittlung der spezifischen Effizienz einer Fusion wird nun aus der Anzahl bewachsener wells, bzw. der Anzahl von wells mit spezifisch reagierendem Antikörper, die jeweils geschätzte Gesamtzahl von Klonen und daraus die durchschnittliche Anzahl von Hybridomakolonien pro well berechnet. Die SE ist dann der Anteil spezifischer Hybridomakolonien an den insgesamt gewachsenen Kolonien (Tab. 12).

3.5.2 Klonierung

Um Abkömmlinge einer einzigen Hybridomazelle, also einen Klon, zu erhalten, wurde routinemäßig die Methode der "Limiting Dilution" angewandt und das Wachstum alle zwei Tage mikroskopisch kontrolliert. Da die wells auch Milzzellen als Nährzellschicht (Feederlayer) enthielten, ließen sich die Kolonien erst erkennen, sobald sie aus rund zehn Zellen bestanden. Nur wenn sich keine weiteren Kolonien entwickelten, wurden die Zellen eines wells als monoklonal angesehen. Tab. 13 zeigt eine Zusammenfassung von 29 Klonierungen mit diesem Verfahren. Bei Aussaat von 0,5, 0,25, 0,1 und 0,05 Zellen pro well zeigte sich in rund 20% aller wells Wachstum, davon enthielten annähernd die Hälfte Einzelkolonien.

Da es sich bei der Limiting Dilution um eine rein statistische Methode handelt (Fazekas de St. Groth, 1982), bei der nicht mit Sicherheit die rechnerisch ermittelte Zellzahl in die Vertiefungen gelangt und auch die Beobachtung des Wachstums mit Fehlern behaftet ist, z.B. versehentliches Verteilen eigentlich monoklonaler Zellen beim Füttern, wurde jede positive, aber nicht sicher monoklonale Kolonie sofort nochmals kloniert, ebenso wieder aufgetaute Zellen, um etwaigen genetischen Veränderungen zu begegnen. Hierbei wurden im allgemeinen Verdünnungen von 0,5, 0,25 und 0,1 Zellen pro 0,1 ml (d.h. pro well) gewählt, da so genügend Zellen mit einem arbeitstechnisch zu bewältigenden Anteil an monoklonalen Kolonien überlebten. Nach der Poisson-Verteilung waren in ca. 90% der der bewachsenen wells Einzelkolonien zu erwarten. Infolge der strengen Auswahl wurden praktisch nur 40-60% als monoklonal angesehen, was einer Kloniereffizienz von rund 50% entspricht. Die Kloniereffizienz ist definiert

Tab. 12: Zusammenfassung der Fusionen von X63-Ag8.653-Myeloma mit Milzzellen von gegen PGK-2 geimpften Balb/c-Mäusen

Fusion	Impfung		Plasma anti PGK			Aussaat:		Wachstum		anti PGK-2		% spezifische Effizienz
	1. Injektion i.m.	2. Injektion i.p. (0.2 ml PBS)	1A	1B	2A	2B	Anzahl wells nach Fusion	in % aller wells	kein Wachstum wegen	in % aller wells	Pferdeserum	
1	13 µg PGK-2B (PBS/IFA)	75 µg PGK-2B	-	-	-	24	4x96= 384					
2	25 µg PGK-2B (PBS/IFA)	66 µg PGK-2A	-	-	30	nm	1x96= 96 3x24= 72	41 71	6.3 18		14	
3	50 µg PGK-2A (PBS/IFA)	90 µg PGK-2A	-	-	-	-	4x24= 96	95	27		11	
4	15 µg PGK-2A (PBS/IFA)	60 µg PGK-2A	3.5	7	nm	7	4x24= 96	100		9.4	n.a.	
5	15 µg PGK-2A (PBS/CFA)	75 µg PGK 2A	6	125	2	303	4x24= 96	100		25	n.a.	
6	50 µg PGK 2B (PBS/CFA)	50 µg PGK 2B	25	29	19	23	8x96= 768	22		5.1	23	
7	31 µg PGK 2A/2B (PBS/IFA)	40 µg PGK-2A/2B	280	270	350	450	6x96= 576	29		5.2	16	

n.a. = nicht auswertbar, nm = unter Nachweisgrenze;

als praktisch erzielt Wachstum dividiert durch theoretisches, potentielles Wachstum.

Tab. 13: Kloniereffizienz von Limiting Dilution und manueller Aussaat von Einzelzellen

	Limiting Dilution						manuell
Aussaat: theoret. Anzahl Hybr. / well	2	1	0.5	0.25	0.1	0.05	1
Anzahl der wells	192	432	720	768	276	168	362
bewachsene wells	146	169	147	125	46	28	76
± % aller wells	76	39	20	16	17	17	21
davon monoklonal bewachsen	17	47	72	52	29	14	70
erwartete % nach Poisson	45	77	89	92	91	91	89
± erwartete Anzahl monoklonal bew. wells	66	130	126	114	42	25	68
Kloniereffizienz %	26	36	57	46	69	56	103

Die Soft-Agar-Methode (Tzartos und Lindstrom, 1981), bei der die Zellen in 0.25% Agar (Difco) auf einer Schicht von 0.5% Agar kultiviert werden, erwies sich als ungeeignet, da die Zellen die relativ hohen Temperaturen von 45°C beim Mischen und die veränderten Kulturbedingungen trotz beigefügter Feederzellen nicht überlebten.

Interessante Kolonien wurden gelegentlich auch rekloniert, indem Tropfen von ca. 10 µl einer 100 Zellen/ml Verdünnung mikroskopisch auf die Anwesenheit von nur einer Zelle untersucht und solche Einzelzellen dann in je eine Vertiefung einer 96well-Kulturplatte überführt wurden (Sijens et al., 1983). Dieses manuelle Verfahren ist allerdings sehr zeitaufwendig und die Anzahl der angewachsenen Zellen im Vergleich zur Limiting Dilution deutlich geringer. Nur 21% aller kultivierten Zellen überlebten, davon konnten jedoch 92% als sicher monoklonal betrachtet werden.

3.5.3 Hybridomaauswahl

Es folgt eine kurze Beschreibung von Hybridomazellen, die hauptsächlich verwendet wurden. Die in Tab. 14 angegebenen Extinktionen entstammen qualitativen ELISA-Bestimmungen mit verschiedenen Konju-

gaten, ließen sich also nur bei quantitativer Auswertung miteinander vergleichen.

Tab. 14: Qualitative ELISA-Bestimmungen der Hybridoma-Antikörper

a) Hybridoma-Kulturüberstände

anti PGK	1A	1B	2A	2B
HY 28.5F3 (1:2)	0.010	0.013	0.038	0.303
HY 28.5B5 (1:2)	0.460	0.546	0.175	0.615
HY 20-1	0.029	0.016	0.022	0.112
HY 20-1/A1	0.007	0.078	0.008	0.225
HY 20-1/A2	0.015	0.115	0.019	0.236
Hy 20-1/S119-6	0.033	0.050	0.137	0.061
HY 38-4	0.029	0.038	0.007	0.221
HY 38-4/A1	0.016	0.170	0.028	0.266
HY 38-4/A2	0.019	0.169	0.012	0.199
HY 38-4/S123-A4	0.008	0.012	0.078	0.013
HY 65-1	0.008	0.110	0.007	0.023
HY 103-2	0.868	0.872	0.784	0.846

Angegeben sind die Extinktionen bei 405 nm abzüglich Leerwert (statt Probe PBS/Tween) mit 1) Konjugat III, 1:300; 2) Konjugat IV, 1:250; 3) Sigma-Konjugat, 1:6000; alle anderen mit Konjugat IV, 1:200.

b) Ascites nach 50% AS

anti PGK	1A	1B	2A	2B
HY 28.5F3 (1:3)	0.028	0.026	0.558	0.250
HY 28.5B6 (1:3)	0.291	0.465	0.451	0.156
20-1/A1-IgG (38 µg/ml)	0.062	0.044	0.095	0.069
20-1/A2 (26 µg/ml)	0.159	0.142	0.179	0.176
38-4/A1 (22 µg/ml)	0.134	0.109	0.147	0.136
38-4/A235 (µg/ml)	0.102	0.085	0.144	0.104

Angegeben sind die Extinktionen bei 405 nm abzüglich Leerwert mit Sigma-Konjugat, 1:6000.

HY 103-2

Von den mit allen vier getesteten PGK-Varianten gleich stark reagierenden Antikörpern wurde die monoklonale Kolonie 103-2 (6. Fusion) weiter vermehrt. Es stellte sich allerdings heraus, daß dieser Antikörper fast in gleichem Maße auch unspezifisch an nur mit FCS beschichtete ELISA-Platten band. Andere Hybridomaproben mit unspezifischer Plattenbindung resultierten allerdings in einer geringeren Extinktion, wenn die wells mit PGK beschichtet worden waren. Demnach sind negative Kontrollen wie Puffer oder FCS statt Antigen ebenso mit Vorsicht zu bewerten wie positive Ergebnisse. Als Leerwert, der routinemäßig von den gemessenen Extinktionen abgezogen wurde, galt daher: Beschichtung mit PGK und als "Probe" PBS/Tween, HY-Medium oder Kontrollplasma ungeimpfter Mäuse. Kulturüberstände von HY 103-2 wurden wegen ihrer starken Reaktivität mit PGK trotz der unspezifischen Plattenbindung für Versuche verwendet.

HY 20-1

Dieser Klon der 3. Fusion galt zunächst als der vielversprechendste, da seine Kreuzreaktivität mit PGK-1B geringer war als bei allen bis dahin untersuchten poly- und monoklonalen Antikörpern. Mit den Zellen wurden Ascites erzeugt, 20-1/A1 und 20-1/A2, und mit 20-1/A1 eine PAS-Chromatographie durchgeführt. Das pH 2.3 Eluat wurde als 20-1/A1-IgG bezeichnet und bestand nach semiquantitativer ELISA-Auswertung zu 100% aus Maus-IgG, von dem 0.01% anti-PGK-2 Reaktivität zeigten. Von den mit 50% AS ausfällten Proteinen des Ascites 20-1/A2 reagierten 0.06% mit PGK-2 (1.5% Maus-IgG). Als weitere Fusionen zu keinem besseren Ergebnis führten, wurden HY 20-1-Zellen, sowohl aus dem Platten- wie auch aus dem Flaschenstadium, wieder aufgetaut und erneut kloniert. Alle Klonierungsversuche führten jedoch nur zu Klonen mit sehr viel geringerer Reaktivität und größerer Kreuzreaktivität als beim Originalklon. Zudem erwies sich die Antikörperproduktion als instabil; nach mehreren Passagen ließ sich kaum noch anti-PGK Reaktivität feststellen. Die noch am ehesten verwertbaren Hybridomakulturüberstände eines Subklons stammten von als 20-1/S119-6 bezeichneten Zellen.

HY 38-4

Dieser Klon der 4. Fusion reagierte zwar auch mit PGK-1B, jedoch deutlich stärker mit PGK-2B. Er wurde daher in die Reihe der näher

untersuchten Hybridomas aufgenommen. Die damit produzierten Ascites wurden mit 38-4/A1 und 38-4/A2 bezeichnet. Mittels PAS-Chromatographie und Elution mit Puffern unterschiedlichen pH's wurde versucht, die von 38-4/A1 produzierte IgG-Subklasse anzureichern. Das Elutionsprofil zeigt Abb. 12, die dazugehörigen ELISA-Ergebnisse Tab. 15. Bei pH 7.0 konnte kein Protein eluiert werden. Nach diesem Verfahren stieg die Kreuzreaktivität, alle Fraktionen reagierten mit PGK. Auch hier wurde versucht, wieder aufgetaute Zellen zu reklonieren, ebenfalls mit mäßigem Erfolg. Als Beispiel dient der Subklon 38-4/S123-A4.

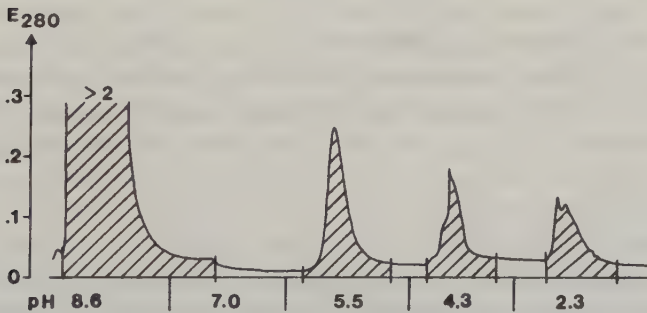


Abb. 12: Elutionsprofil der Protein A-Sepharose Chromatographie von Ascites 38-4/A1

Tab. 15: Protein A-Sepharose Chromatographie von Ascites 38-4/A1

	78 mg Protein über PAS			
	pH 8.6	pH 5.5	pH 4.3	pH 2.3
IgG nach 50% AS	59 mg	0.28 mg	0.27 mg	0.17 mg
ELISA: anti PGK-1A	13µg = 0.02%	0.04µg = 0.01%	0.06µg = 0.02%	0.16µg = 0.09%
anti PGK-1B	101g = 0.02%	na	na	0.16µg = 0.09%
anti PGK-2A	19µg = 0.03%	0.20µg = 0.07%	0.17µg = 0.06%	0.50µg = 0.30%
anti PGK-2B	14µg = 0.02%	0.16µg = 0.06%	0.17µg = 0.06%	0.40µg = 0.23%
Ouchterlony	IgG1, 2?	IgG1, (2a)	IgG2a, 3, 1, (2b)	IgG2b, 1, (2a)

Chromatographiert wurde in 50% Ammoniumsulfat ausgefälltes IgG. Bei pH 7.0 konnte kein Protein eluiert werden. Die Ausbeute betrug 98% nach PAS und 77% nach erneuter Ausfällung mit 50% AS. Die Konzentrationsangaben für die Antikörperreaktivitäten mit PGK sind semiquantitative Werte (siehe Abschnitt 3.2.2!).

na = nicht auswertbar wegen zu geringer eingesetzter Konzentrationen.

HY 65-1

Nach der 5. Fusion konnte ein Klon isoliert werden, der als einziger vor allem mit PGK-1B reagierte. Da zu wenige der ursprünglichen Zellen eingefroren worden waren und Reklonierungen erfolglos blieben, konnte diese Linie leider nicht erhalten werden. Mit dem erzeugten Ascites 65-1/A1 wurde ebenfalls eine PAS-Chromatographie durchgeführt. Der Hauptteil der anti-PGK Reaktivität befand sich hier im pH 2,9 Eluat. Da auch in diesem Fall der pH 8,0 Durchlauf mit PGK reagierte, wurde dieser Pool für Versuche verwendet, um den einzigen Vorrat an 65-1/A-IgG zu schonen.

HY 28.5F3 und HY 28.6B5 (Blüthmann et al., 1982)

Proben dieser beiden Kulturüberstände wurden uns freundlicherweise von H. Blüthmann zur Verfügung gestellt und als positive Kontrollen verwendet. HY 28.5F3 reagierte vor allem mit PGK-2, HY 28.6B5 mit PGK-1 und PGK-2.

3.5.4 Subklassen

Die IgG-Subklassen der Kulturüberstände von Hybridomalinien wurde mittels Ouchterlony Doppelimmundiffusion bestimmt. Bei durch Ammoniumsulfatfällung konzentrierten Antikörperproben resultierten jedoch nur sehr schwache oder keine Präzipitatbanden.

Aufgrund der höheren Empfindlichkeit wurde versucht, die Subklassenbestimmung mit dem ELISA-Verfahren durchzuführen. Dazu wurden die Mikrotiterplatten mit 1:2000 verdünnten Antisera vom Kaninchen, die laut Produktbeschreibung (Bionetics) gleiche Titer aufwiesen, beschichtet und weiter wie beschrieben verfahren. Als Standard-Maus-IgG und anti-Maus-IgG/Enzym-Konjugat wurden dieselben Substanzen wie bei den Screeningtests verwendet. Hybridomamedium, 20% FCS, mit 50% Ammoniumsulfat behandelt, dienten als negative Kontrolle. Referenzkurven sind in Abb. 8 dargestellt (Abschnitt 3.2.2). Die resultierenden Extinktionen der Proben deuteten auf das Vorhandensein mindestens zweier Immunglobulinklassen hin. Da dieses Ergebnis auch bei sicher monoklonalen Antikörpern auftrat, bei HY 103-2 z.B. mit Extinktionen bis 0,7 bei allen vier Isotypen, bei HY 38-4 mit Reaktivität gegen IgG2a und IgG2b, bestätigte sich der Verdacht mangelhafter Spezifität im empfindlichen ELISA-System. Eventuell lag hier eine Kreuzreaktivität der Antisera mit den leichten Ketten der Maus-IgG's vor, die bei Verwendung von Proteinantigenen in der Maus zu 96% vom

k-Typ sind. Laut Seppälä et al. (1984) hängt das Ergebnis bei IgG2 häufig vom Igh-Allotyp ab. Bei den Hybridomakulturbedständen von Blüthmann et al. (1982) und von HY 20-1, die mit PGK sehr wohl reagierten, ergaben sich nur äußerst geringe, kaum über dem Leerwert liegende Extinktionen.

3.5.5 Vergleich der Affinitäten

Mit jeder in 50% AS ausgefällten Antikörperprobe wurde, wie in Abb. 10 illustriert, eine ELISA-Titration durchgeführt. Die bei gleichen Proteinmengen resultierenden, unterschiedlichen Extinktionen (vgl. Abb. 12, Tab. 14b) beseitigen das Problem der nur begrenzt möglichen quantitativen Auswertung. Zwar ergaben die mittels Referenzkurve errechneten anti-PGK Reaktivitäten bei unterschiedlichem Proteineinsatz einer Probe übereinstimmende Werte, die Ergebnisse für im ELISA gemessenes Proben-Maus-IgG lagen jedoch auch nach PAS-Chromatographie weit unter den laut E_{280} -Messung eingesetzten Mengen und variierten stark je nach eingesetzter Konzentration der jeweiligen Probe. Nur bei stark verdünntem Ascites 20-1/A1-IgG stimmten beide Messungen noch besser als bei anti-PGK-2 Ascites-IgG überein. Eine differenziertere Ausfällung mit 30% und 30-50% AS führte zu keiner Verbesserung, daher wurde die Präzipitation mit 50% AS zur Konzentrierung und Aufbewahrung beibehalten, um die ohnehin geringen Mengen an Antikörper einigermaßen vollständig zu erfassen. Bei Umrechnung der anti-PGK Reaktivitäten anhand der Referenzkurve in $\mu\text{g/ml}$ (RK/ml) wird der geringe Anteil an Antikörpern am Gesamtprotein deutlich (Tab. 16).

Die ELISA-Ergebnisse waren in qualitativer und quantitativer Hinsicht reproduzierbar, so daß verminderte Werte wohl auf Instabilität der Hybridomazellen und der Antikörperproben zurückzuführen sind. Als weitere Ursache für unterschiedliche Resultate kommen jedoch trotz gleicher Behandlung auch die PGK-Dialysate in Betracht, von denen Aliquots für die ELISAs eingefroren wurden. Normalerweise immer mit PGK-2B am stärksten reagierende Proben reagierten bei einer PGK-Charge plötzlich mehr mit PGK-2A (vgl. Tab. 14!). Gleiches gilt für PGK-1B und PGK-1A. Offenbar hängt das Meßergebnis also auch vom Zustand der verwendeten PGK und ihrer Anheftung an die Platte ab, so daß generell im Grunde nur von anti-PGK-1 und anti-PGK-2 Reaktivität gesprochen werden kann. Eine wirkliche Unterscheidung zwischen den elektrophoretischen Varianten der jeweiligen Isozyme ist demnach mit dem hier durchgeführten ELISA nicht möglich.

Tab. 16: Qualitative ELISA-Bestimmung der Hybridomaascites-Antikörper

	Gesamtprotein	% des Gesamtproteins				
		nach 50% AS	Maus-IgG		anti-PGK-	
		laut E_{280} (100 %)	laut ELISA	1A	1B	2A 2B
Asc.20-1/1-Ig	3,1 mg		100	0,009	0,005	0,011 0,010
Asc.20-1/2	22 mg		1-2	0,05	0,04	0,06 0,05
Asc.20-1/S119-6	137 mg		ca. 10	0,017	0,013	0,033 0,021
Asc.38-4/1	156 mg		ca. 5	0,04	0,03	0,06 0,04
Asc.38-4/2	36 mg		ca. 8	0,010	0,008	0,019 0,010
Asc.38-4/S123-A4	91 mg		ca. 7	0,010	0,005	0,015 0,01

Die aus den Extinktionen semiquantitativ in $\mu\text{g/ml}$ umgerechneten anti-PGK Reaktivitäten und Maus-IgG-Anteile sind in Prozent des Gesamtproteins nach Fällung mit 50% AS angegeben.

3.5.6 Eliminierung der Kreuzreaktivität

Zur Herstellung eines PGK-1-Gels wurden 1,7 mg PGK-1B in 0,3 ml PBS, pH 7,2, 1mM DTE mit 75 μl 2,5% Glutardialdehyd vernetzt (24 h, 4°C). Das Gel wurde mit PBS/DTE gewaschen (16000 g, 2 min), bis der Überstand laut E_{280} kein Protein mehr enthielt. Ein Aliquot des Gels wurde in 0,5 ml PBS/DTE, das andere in 1 ml 0,1 M Citrat, 0,1 M Phosphat, pH 3 aufgenommen, 8 min bei RT geschüttelt und abzentrifugiert. Beide Gele wurden dann erneut mit PBS gewaschen und mit je 150 μl HY 20-1/S103-3 (mit AS ausgefälltes Protein aus 1 ml HY) versetzt. Nach 1h Schütteln bei 4°C und viermaligem Waschen mit PBS wurde gebundenes Protein mit 300 μl Citratpuffer eluiert und mit 75 μl 1 M Tris, pH 8,5 neutralisiert. Die nach den Waschungen zusammengefaßten Überstände (je 1 ml) wurde gleichzeitig mit Proben der Originallösung im ELISA getestet. Es wurde darauf geachtet, daß die Verdünnungen der Proben relativ zum Originalvolumen einander soweit möglich entsprachen. Die Extinktionswerte sind in Tab. 17 wiedergegeben. Ein Teil der anti-PGK Reaktivität wurde an das Gel gebunden und durch pH 3 Behandlung wieder entfernt, reagierte jedoch auch mit PGK-2.

Ein weiterer Versuch wurde mit der 30-50% AS-Fraktion eines polyklonalen anti-PGK-2 Ascites durchgeführt. Das mit 0,45 mg PGK-1B und 19 μl GDA hergestellte Gel wurde nicht mit Citratpuffer vorbehandelt. Tab. 17 zeigt die ELISA-Ergebnisse.

Es war nicht möglich, die anti-PGK-1B Reaktivität von der anti-PGK-2 Reaktivität abzutrennen, was auf ähnliche Determinanten schließen läßt, die bei den auf der ELISA-Platte haftenden PGK-Isozymen 1A, 1B und 2A wesentlich schwerer zugänglich waren als bei PGK-2B.

Tab. 17: Adsorptionsversuch mit PGK-1B-Gel

anti-PGK	1A	1B	2A	2B
Original HY 103-3	0.076	0.095	0.059	0.114
30% AS:	0.047	0.050	0.036	0.085
Überstand nach				
PGK-1B-Gel + PBS	0.035	0.044	0.032	0.070
PGK-1B-Gel + pH 3	0.014	0.022	0.022	0.056
30-50% AS:		nm		
Überstand nach				
PGK-1B-Gel + PBS	0.006	0.008	0.005	0.015
PGK-1B-Gel + pH 3	0.018	0.032	0.018	0.044
Originalascites 1:200	0.068	0.169	0.119	0.411
30-50% AS:		nm		
Überstand, 1:100, nach				
PGK-1B-Gel + PBS	0.059	0.110	0.152	0.305
PGK-1B Gel + pH 3	0.027	0.048	0.152	0.179

Angegeben sind Extinktionswerte bei 405 nm.

nm = nicht gemessen

3.5.7 Kompetitiver ELISA

Wird die ELISA-Testplatte mit einem Antigen Nr.1 beschichtet und der zu testende Antikörper mit einem anderen Antigen Nr.2 vorinkubiert, so sollten gleiche Determinanten auf dem konkurrierenden Antigen Nr.2 zu einer ebenso geringen Extinktion führen wie eine Vorinkubation des Antikörpers mit dem Beschichtungsantigen Nr.1. Beschichtet wurde hier mit 8 µg/ml PGK, wie üblich gefolgt von 5% FCS; die Vorinkubation erfolgte 1 h bei RT mit 0.1 mg/ml Protein der Antikörperproben und

8 µg/ml PGK in PBS/Tween. Diese Konzentrationen waren in Vorversuchen ermittelt worden. Keine Konkurrenz liegt im Falle einer höheren Extinktion als bei Vorinkubation mit dem Beschichtungsantigen vor; die Determinanten sind dann auf dem kompetitiven Antigen entweder nicht vorhanden oder nicht zugänglich.

Die Ergebnisse einiger Antikörperproben zeigt Abb. 13. Demnach wird bei Ascites 38-4/A1, Ascites 38-4/A2, Ascites 20-1/A2 und HY 103-2 die übliche Bindung mit PGK-1B und -2B durch Vorinkubation mit PGK-2B gehemmt, durch Vorinkubation mit PGK-1B dagegen leicht verstärkt. Ähnliche Verhältnisse ergaben sich dosisabhängig bei Ascites 20-1/A1-IgG und HY 38-4/S123-A4. Nach den Beschichtungsversuchen (vgl. Abb. 6d!) konnte die Extinktion für eine gegebene Antikörpermenge nur geringfügig durch eine höhere PGK-Beschichtungskonzentration verstärkt werden. Damit ließe sich zwar die leicht verstärkte Bindung bei Beschichtung und Vorinkubation mit PGK-1B erklären, dies erscheint jedoch angesichts der Verhältnisse bei Verwendung von PGK-2 als unwahrscheinlich. Die Bindung von 20-1 und 38-4 an mit PGK-1B oder -2B beschichtete Platten wird durch Vorinkubation mit PGK-2B behindert, die Antikörper binden demnach erwartungsgemäß an jeweils gleiche Determinanten auf beiden PGK-Isozyemen. Allerdings wirkt PGK-1B wider Erwarten nicht kompetitiv, auch nicht mit PGK-1B-Beschichtung, so daß die Determinanten bei PGK-1B in Lösung im Gegensatz zu angehefteter PGK-1B kaum zugänglich zu sein scheinen. Eventuell läßt sich eine stärkere Entfaltung der PGK-2 unter den ELISA-Testbedingungen vermuten. Dies würde auch die unterschiedlichen Testergebnisse bei Verwendung verschiedener PGK-Chargen erklären, bei denen ja mehr auf den Proteingehalt als auf die spezifische Aktivität und eventuelle Denaturierung geachtet wurde, die Anheftung also durchaus nicht immer auf die gleiche Weise erfolgen mußte.

Bei Ascites 65-1 weist umgekehrt die etwas höhere Extinktion mit kompetitiver PGK-2B auf in geringerer Anzahl gebundene Epitope hin, während bei konkurrierender PGK-1B die niedrigere Extinktion mehr Determinanten hinsichtlich der Zahl oder Zugänglichkeit bedeutet. Die in jedem Fall deutliche Verstärkung der PBS/Tween-Extinktion durch Vorinkubation mit PGK trat bei einem Vorversuch auch mit den anderen beiden Antikörpertypen 38-4 und 20-1 auf (Beschichtung mit 2 µg/ml PGK; Vorinkubation mit 5 µg/ml PGK), nicht jedoch mit 65-1, der in weitaus geringerer Konzentration als in Abb. 13 eingesetzt worden war (4 µg/ml Protein). Möglicherweise liegen die korrespondierenden Epitope mehrfach

vor, so daß bei im Überschuß zugesetzten Antikörpern zusammen mit der in Lösung befindlichen und gebundenen PGK an der Platten-PGK eine Vernetzung auftritt, bei der im Endeffekt mehr Antikörper an die Platte gebunden werden als im üblichen Screening-System mit PBS/Tween und bei einer gerade für die gelöste PGK ausreichenden Antikörpermenge.

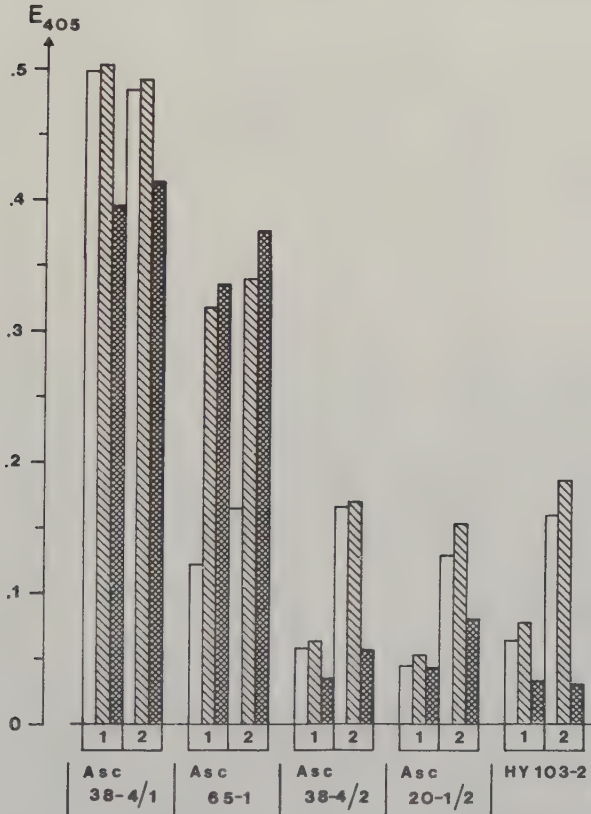


Abb. 13: Kompetitiver ELISA mit Sigma-Konjugat 1:6000

Die Zahlen 1 und 2 beziehen sich auf die Beschichtung mit PGK-1 oder -2.

- ☐ Probe vorinkubiert in PBS/Tween
- ☒ Probe vorinkubiert mit PGK-1
- ☒ Probe vorinkubiert mit PGK-2

3.5.3 Hemmung der PGK-Aktivität

Im Standardaktivitätstest wurden 1 U/ml PGK-1A/1B, bzw. PGK-2A/2B vor und nach 24-stündiger Inkubation bei 4°C mit verschiedenen Antikörperproben in einem Gesamtvolumen von 200 µl gemessen. Als Kontrollen, die zu keinerlei Reduktion der Aktivität führten, dienten HY-Medium, Borat/Saline und Kontrollplasma in entsprechenden Volumina. Die Varianz

Tab. 18: Immunhemmung der PGK-Aktivität

Antikörper	Protein in 200 µl	Aktivitätsabnahme um % der Ausgangswerte	
		PGK-1	PGK-2
Asc. 20-1/2	26 µg	13	0
	65 µg	0	16
	130 µg	23	67
	195 µg	57	60
	195 µg*	33	36
	130 µg*	2A-Spermienlysat: 0 %	
Asc. 38-4/1	170 µg*	46	28
	230 µg	62	80
Asc. 38-4/2	250 µg	11	67
	500 µg	61	73
	1.25 mg	65	38
	2.50 mg	47	44
	2.50 mg*	44	39
Asc. 65-1, pH8	77 µg	13	73
HY 103-2	1:2	0	16
	1:2*	19	0
anti-PGK-2-			
-Plasma, pH 3	155 µg	0	0
anti-PGK-2-			
-Ascites, pH2,3	85 µg	0	0
	85 µg*	4	4
	220 µg*	8	0
	43 µg	2A-Spermienlysat: 20 %	
		2B-Spermienlysat: 0 %	
		2C-Spermienlysat: 38 %	

Im Test wurde 1 U/ml PGK eingesetzt, wobei PGK-1 eine spezifische Aktivität von 492 U/mg (bzw. *79 U/mg), PGK-2 eine spezifische Aktivität von 55 U/mg (bzw. *2 U/mg) aufwiesen.

der Messungen betrug 5-8% Abweichung vom Mittelwert (3 Meßreihen), nur eine Aktivitätsverminderung um mindestens 10% wurde daher als positiv gewertet. Aus Tab. 18 wird ersichtlich, daß nur die monoklonalen Antikörper zu einem deutlichen Effekt führten, vor allem bei PGK-2, obwohl PGK-2 trotz gleicher Aktivität in wesentlich höherer Proteinkonzentration vorlag als PGK-1, und die Antikörper auch an denaturiertes Enzym binden. Die polyklonalen Antikörper zeigten dagegen trotz ihrer laut ELISA-Titration höheren Affinität keine Wirkung. Die unterschiedliche Dosisabhängigkeit der Aktivitätsverminderung bei PGK-1 und -2 im Falle von Ascites 20-1/1 und Ascites 38-4/2 legt ein mögliches optimales Verhältnis von Antigen zu Antikörper nahe.

3.6 IMMUNFLUORESZENZ AN SPERMIEN

3.6.1 Spermienpräparation

Zunächst wurde die Überlebensdauer in verschiedenen Puffern ohne NaN_3 unter sterilen Bedingungen geprüft. Die Beweglichkeit (Motilität) galt als Kriterium für Unversehrtheit. Die Verdünnung der Spermien wurde so gewählt, daß ca. 100 Spermien im mikroskopischen Gesichtsfeld sichtbar waren. Wie Tab. 19 zeigt, war der größte Teil der Spermien bereits eine Stunde nach der Entnahme aus den Nebenhoden und einer Zentrifugation von 200g, 10 min, wobei nur die obere Hälfte des Überstands abpipettiert wurde, unbeweglich.

Tab. 19: Motilität von Mausspermien in verschiedenen Puffern

Zeit nach Entnahme	Motilität	Hoppe's Medium		Hank's BSS		PBS	Burck-C	Baker
		Überstand Pellet				Pellet		
1 h	fortbw.	15	3	0	0	2	4	
	ortsbw.	25	10	10	5	10	10	
	unbew.	60	87	90	95	88	86	
3 h	fortbw.	5	3	1	1	0	0	
	ortsbw.	15	5	5	2	2	0	
	unbew.	80	92	94	97	98	100	
8 h	fortbw.	3	1	0	0	0	0	
	ortsbw.	4	2	4	3	2	0	
	unbew.	93	97	96	97	98	100	

Die Zahlen geben die prozentualen Anteile fort-, orts- und unbeweglicher Spermien zu unterschiedlichen Zeiten nach ihrer Entnahme aus Nebenhoden und einmaliger Zentrifugation wieder.

Wesentlich bessere Ergebnisse lieferte dagegen OKUDA/BRAUN-Medium, pH 7.4 (Toyoda und Chang, 1974) mit der für Mauszellen erforderlichen Osmolarität von 300 mOsm. Nach einer Stunde und einmaliger Zentrifugation (200 g, 10 min) konnte unter den sedimentierten Spermien noch 90% Motilität beobachtet werden, nach sechs Stunden noch 50%. Ungefähr 0.3% der gesamten Spermien befanden sich nach der Zentrifugation noch im Überstand. Sicherheitshalber wurde bei späteren Waschvorgängen eine Zentrifugation von 10 min bei 1000 oder 4000 g gewählt.

Als Hauptproblem erwies sich die Entfernung somatischer PGK-1. Der Anteil von Somazellen - und damit auch die Anlagerung von Spermien an diese - ließ sich vermindern, indem die Nebenhoden nur eingeschnitten, aber nicht zerkleinert, und die über dem Zellsediment schwimmenden Spermien abpipettiert wurden. Zur Kontrolle der Wascheffizienz wurden drei Spermienaliquots nach ein-, zwei- oder dreimaliger Zentrifugation wie die in Abschnitt 2.14.4 beschriebenen Fibroblasten lysiert und mittels PGK-Cellogel-Elektrophorese auf Anwesenheit von PGK-1 geprüft. Eine Behandlung mit Ultraschall bewirkte keine nennenswerte Erhöhung der PGK-Aktivität im Extrakt. Nach drei Waschvorgängen zeigte sich bei Balb/c- und C3H-Spermienpräparationen nur noch eine sehr schwache PGK-1 Bande (ca. 10%). Dagegen ließ sich trotz völlig gleicher Behandlung die somatische PGK von 129/Sv-Spermien meist nur in geringem Ausmaß entfernen (70-80% PGK-1B). Gute Präparationsergebnisse zeigen Abb. 14 und Tab. 20.

Tab. 20: Spermienpräparationen

Stamm	Balb/c	C3H/Aa	129/Sv	Human
PGK	2A/1B	2B/1A	2C/1B	2 / 1
Motilität % ortsbw.	60%	70%	40%	zus.ca.
% fortbw.	20%	20%	10%	90%
Gesamtspermienzahl nach 3x 4000g, 10 min	624×10^5	213×10^5	631×10^5	200×10^5
Gesamtsaktivität PGK	3.01 U	0.97 U	0.054 U	0.53 U
$\hat{=}$ mU / 10^6 Spermien	48 mU	46 mU	0.9 mU	26.5 mU
restliche PGK-1	10% 1B	10% 1A	76% 1B	20-40% *

Angegeben sind die Resultate von Spermienpräparationen aus je 10 Nebenhoden von fünf Mäusen und aus menschlichem Ejakulat. * Referenz: Vogel, 1985.

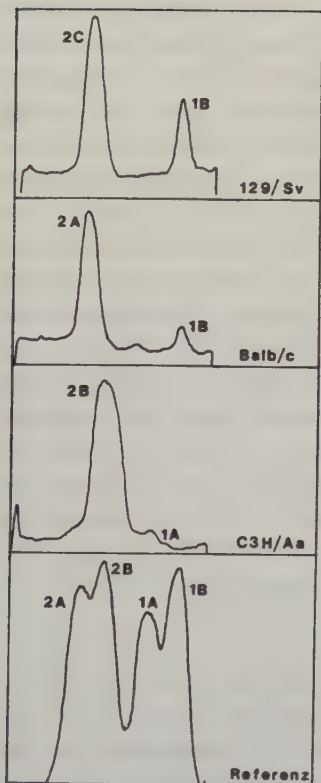


Abb. 14: Zymogramm einer PGK-Cellogel-Elektrophorese mit Extrakten gewaschener Spermien aus Nebenhoden von C3H/Aa-, Balb/c- und 129/Sv-Mäusen mit jeweils 5% PGK-1A, bzw. 10% PGK-1B und 19% PGK-1B.

Humanspermien aus Ejakulaten, die uns freundlicherweise von Fr. Dr. Töpfer-Petersen (Dermatologisches Institut der Universität München) zur Verfügung gestellt wurden, wurden wie die Mausspermien gewaschen. PGK-2 aus Rinderspermien entstammte einer der Maus-PGK-2 Präparation entsprechenden Isolierung.

Die zum Schluß noch einmal mit Tris-Saline gewaschene Suspension wurde auf 10^6 Spermien/ml verdünnt, wobei 0.05% NaN_3 im Puffer die Beweglichkeit erstaunlich wenig beeinträchtigte, sodann tropfenweise mit einer Pasteurpipette auf beschichtete Objektträger mit 8 Aussparungen aufgetragen und mindestens eine Stunde im Laminar-Airflow luftgetrocknet. Formaldehyd (0.1% in PBS, pH 8, 10 min) als Fixierungsmittel zur Vernetzung von Proteinen erwies sich als ungeeignet, da sich dadurch

spinnwebartige Strukturen ergaben, die die mikroskopische Betrachtung der Spermien überaus erschwerten. Eine fünf- bis zehnmünütige Fixierung mit eiskaltem Methanol, um das Eindringen der Antikörper in die Zellen zu ermöglichen, verhinderte die "Spinnwebenbildung" völlig. Eine weitere Verbesserung der Präparate wurde durch eine Inkubation der Spermien suspension in Tris-Saline, 0.05% Nonidet P40 (NP40), 2 mM Mercaptoäthanol (ME), 0.02 NaN_3 (30 min, RT) vor dem vorsichtigen Auftragen auf die Objektträger erzielt. Bei diesem Verfahren ist eine Fluoreszenzmarkierung im Reagenzglas nicht mehr möglich, da die Spermien bereits bei der ersten Waschzentrifugation zerstört werden. Bei der Objektträgermethode behalten die Spermien dagegen bis zum Trocknen der Flüssigkeit ihre Form, ihre Köpfe breiten sich erst dann - buchstäblich im letzten Moment - aus. Besonders stark ist dieser Effekt bei Verwendung von 10 mM ME im NP40-Puffer, wobei allerdings viele Köpfe bis zum Platzen quellen. Die Spermien Schwänze quellen in keinem Fall. Die in der Literatur (z.B. Feuchter et al., 1981; Holt, 1984) des öfteren beschriebenen Cytoplasmatröpfchen an der Mittelstückregion traten gelegentlich auf, nicht aber nach Behandlung mit NP40 / ME.

3.6.2 Spermienfluoreszenz

Als negative Kontrollen dienten Tris-Saline, HY-Medium, Maus-IgG, anti-Maus-IgG vom Kaninchen (1 mg/ml) und Plasma ungeimpfter Mäuse, letzteres jeweils in den den Antikörperproben entsprechenden Proteinkonzentrationen. Ohne Methanolfixierung ergab sich eine etwas schwächere Fluoreszenz, die Färbung blieb gleich. Die Unterdrückung unspezifischer Fluoreszenz wurde mit Eriochromschwarz (Fey, 1972) durchgeführt und resultierte in einer schwach sichtbaren Rotfärbung an den entsprechenden Stellen. Es zeigte sich, daß sich dieses Verfahren bei sauberen, von somatischen Zellen befreiten Spermienpräparationen erübrigt.

Unbehandeltes Plasma ungeimpfter Mäuse führte nach der Formolfixierung zu starker, nach Methanolfixierung zu schwacher Fluoreszenz am Acrosom und nach Behandlung mit NP40/ME zu grünen Umrissen am Hauptstück der Geißel. Wurde das Kontrollplasma wie die Antikörperproben in 50% Ammoniumsulfat ausgefällt und über PAS chromatographiert, so konnte es als negative Kontrolle eingesetzt werden: nur sehr hohe Proteinkonzentrationen (2-5 mg/ml) bewirkten eine schwache Fluoreszenz am gesamten Spermium.

Photographische Aufnahmen werden zu Vergleichszwecken i.a. mit derselben Belichtungszeit durchgeführt. Für eine qualitative Protokollierung genügte die kameraeigene automatische, aber unterschiedliche Belichtung vollkommen, da sich die Intensität der Fluoreszenz sehr gut in der Qualität der Photographien widerspiegelte; d.h. flauere, kontrastarme Negative mit Belichtungszeiten von über einer Minute entsprachen schwächer und kontrastreiche Negative starker Fluoreszenz.

Anti-PGK-2 Ascites führte vor der Auftrennung über PAS (7 mg/ml Protein) bei Spermatozoen, die a) noch in Suspension eine Stunde bei Raumtemperatur mit Antikörper inkubiert und formolfixiert oder b) auf Objektträgern formolfixiert und dann mit Antikörper behandelt worden waren, zu diffuser Fluoreszenz am gesamten Spermium; bei stärkerer Verdünnung (3.5 mg/ml Protein) waren Kopf und Mittelstück deutlicher angefärbt als der Rest. Alle anderen Antikörperproben erwiesen sich nach Formolfixierung als nicht auswertbar.

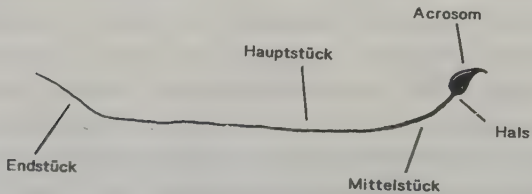
Versuche mit methanolfixierten Spermien, die statt mit NP40/ME mit Tris-Saline vorinkubiert worden waren, resultierten nur bei Einsatz hoher Proteinkonzentrationen in einer schwachen, undeutlich diffusen Anfärbung. Gleiches gilt für nicht gequollene, unfixierte Präparate. Erst die in Abschnitt 2.13.1 beschriebene Vorbehandlung mit NP40/ME lieferte deutliche Ergebnisse. Das übliche Bild zeigte, wie in Abb. 15 skizziert, genaue Umrisse des gesamten Spermiums, das Innere von Kopf und Mittelstück meist schwarz, klar zu unterscheiden von der diffus grünen Hintergrundfärbung, die sich bei Verwendung hoher Proteinkonzentrationen (1-50 mg/ml Protein mit jeweils 25 RK/ml anti-PGK-2A Reaktivität) nicht vermeiden ließ, jedoch bei niedrigen, den in ELISAs eingesetzten Verdünnungen entsprechenden Proteinmengen (100 µg/ml) nicht mehr auftrat. Unterschiede bei den einzelnen Proben zeigten sich im Grunde nur im unterschiedlichen und variablen Fluoreszenzgrad bestimmter Spermienabschnitte, die in Abb. 16 veranschaulicht werden. Tab. 21 soll als zusammenfassende Übersicht der Resultate verschiedener Versuchsansätze dienen.

Feinstrukturen der Spermatozoen waren unter den gegebenen mikroskopischen Möglichkeiten nicht erkennbar (Lichtmikroskop mit Ölimmersionsobjektiv, sinnvolle Objektivvergrößerung max. 40X). Vereinzelt konnte im Mittelstück eine Zickzackstruktur beobachtet werden, die im UV auch fluoreszierte. Aufgrund der Seltenheit wurde diese Färbung jedoch nicht als reproduzierbar gewertet, während das in Tab. 21 aufgeführte Fluoreszenzmuster jeweils an allen Spermien auftrat.

Die starke, konzentrationsabhängige Kopffluoreszenz bei Inkubation mit Ascites 38-4/A1 (1.6-39 mg/ml Protein, 1-25 RK/ml anti-PGK-2) trat schwächer nur noch bei Ascites 20-1/A1-IgG (2 mg/ml Protein, 0.2 RK/ml anti-PGK-2) und in sehr geringem Maße bei anti-PGK-2 Ascites (49 mg/ml Protein, 180 RK/ml anti-PGK-2) auf. Bei allen anderen Proben resultierte an der Stelle des Kopfes ein schwarzer Fleck. Daraufhin wurden alle Proben nochmals in 50% Ammoniumsulfat ausgefällt und auf 20-25 RK/ml anti-PGK-2A Reaktivität konzentriert. Diese starke Kopffluoreszenz ließ sich aber in keinem Fall erneut erreichen, abgesehen von einer diffusen Färbung des Kopfinneren mit klar fluoreszierenden Kopfumrissen. Da bei diesen hohen Proteinmengen die Gefahr verstärkter unspezifischer Bindung bestand, wurden die Proben auch in ELISA-Konzentrationen getestet (100 µg/ml Protein). Hierbei resultierte nur die oben geschilderte Membranfluoreszenz.

Die monoklonale Hybridomalie 103-2 bewirkte ausschließlich an Kopf und Mittelstück eine starke Fluoreszenz, konnte jedoch infolge ihrer großen Kreuzreaktivität mit allen PGK-Isozymen und ihrer unspezifischen Bindung an ELISA-Platten nicht ernsthaft in Betracht gezogen werden.

Maus-Spermatozoon



Human-Spermatozoon

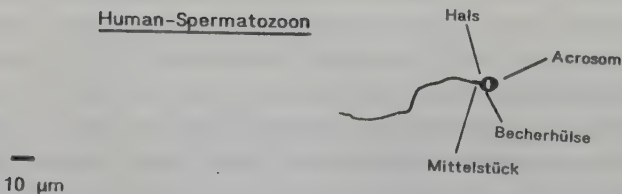


Abb. 15: Illustration von im Lichtmikroskop erkennbaren Spermatozoen-Strukturen

Tab. 21: Übersicht über Sperminimmunfluoreszenz nach Inkubation mit anti-PGK-2 Antikörpern

Versuchstyp	Probe	Proteinkonz.	Fluoreszenz
anti-PGK-2 Plasma			
1) Tris-Saline + Methanol	Gesamtpool pH 2.9	0.2 mg/ml 15 mg/ml	schwach alle Umrisse schwach alle Umrisse
2) Tris-Saline unfixiert	pH 2.9	2.4 mg/ml	schwach alle Umrisse
3) NP40/2mM ME + Methanol	Gesamtpool pH 6 pH 2.9	0.2 mg/ml 50 µg/ml 2.4 mg/ml	stark alle Umrisse, Kopfinneres diffus grün alle Umrisse, Kopfinneres diffus grün alle Umrisse, HS z.T. etwas stärker, Kopfinneres grün gefleckt
4) NP40/2mM ME unfixiert	pH 4.5 pH 2.9	3.0 mg/ml (konz.) 15 mg/ml	stark alle Umrisse, HS etwas schwächer MS etwas stärker als restl. Geißel, Kopf schwarz alle Umrisse, Kopfinneres grün gefleckt
5) NP40/10mM ME unfixiert	pH 4.5 pH 2.9	540 µg/ml 2.4 mg/ml	Verdünnungsreihe ab 340 µg/ml: sehr schwach alle Umrisse MS > ES > HS, Kopf schwarz alle Geißelumrisse, Kopf schwarz
anti-PGK-1A-Plasma-IgG			
4) NP40/2mM ME unfixiert		0.7 mg/ml	schwach Umrisse, K und MS stärker
5) NP40/10mM ME unfixiert	schwach Umrisse	Kopfinneres grün gefleckt	
anti-PGK-1B-Plasma-IgG			
4) NP40/2mM ME unfixiert		0.65 mg/ml	schwach Umrisse, K und MS stärker, Kopfinneres diffus grün
5) NP40/10mM ME unfixiert		0.65 mg/ml	Umrisse außer HS, Kopfinneres grün gefleckt

anti-PGK-2 Ascites

1) Tris-Saline + Methanol	pH 2.3	0.2 mg/ml	alle Umrisse
2) Tris-Saline, unfixiert	Gesamtpool	49 mg/ml 2.2 mg/ml	MS schwächer als restl. Geißel, Kopf schwarz HS stärker als Rest
3) NP40/2mM ME + Methanol	pH 2.3	40 µg/ml	sehr schwach alle Umrisse
4) NP40/2mM ME unfixiert	pH 8.6 pH 2.3	(konz.) 2.2 mg/ml Verdünnungsreihe ab 50 µg/ml: zu schwach	schwach alles außer HS, Kopfinneres diffus grün stark Kopf und MS, ES sehr schwach, Kopfinneres grün gefleckt
5) NP40/10mM ME unfixiert	Gesamtpool	49 mg/ml 2.2 mg/ml (konz.) 2.2 mg/ml	HS stärker als restl. Geißelumrisse, Kopfinneres schwach grün Geißelumrisse, Kopf schwarz HS deutlich stärker als restl. Geißelumrisse, Kopf schwarz a) alle Umrisse, MS am stärksten, Kopfinneres grün gefleckt b) Geißelumrisse, Kopf schwarz

Ascites 20-1/1-IgG

1) Tris-Saline + Methanol	(konz.)	1.9 mg/ml	sehr schwach alle Umrisse negativ
2) Tris-Saline unfixiert	1.9 mg/ml	1.9 mg/ml	schwach alle Umrisse, Kopfinneres diffus grün
3) NP40/2mM ME + Methanol	1.9 mg/ml 0.1 mg/ml	1.9 mg/ml 0.1 mg/ml	Umrisse stark, Hals und HS stärker MS gerade erkennbar
4) NP40/2mM ME unfixiert	(konz.)	(konz.)	Kopfinneres schwarz
5) NP40/10mM ME unfixiert	0.1 mg/ml 1.9 mg/ml	0.1 mg/ml 1.9 mg/ml	Umrisse von K und MS deutlich, HS negativ a) alle Umrisse, MS stärker b) Kopfinneres und MS grün, restl. Geißelumrisse stärker

Ascites 20-1/2

- | | | | |
|---------------------------|----------------|------------|---|
| 1) Tris-Saline + Methanol | Gesamt | 11 mg/ml | negativ |
| 2) Tris-Saline unfixiert | nicht getestet | | |
| 3) NP40/2mM ME + Methanol | | 11 mg/ml | schöne Umrisse |
| | | 0.12 mg/ml | deutliche Umrisse von K, ES, z.T. MS |
| 4) NP40/2mM ME unfixiert | | 0.12 mg/ml | schöne Umrisse, HS schwächer, Kopfinneres z.T. grün |
| 5) NP40/10mM ME unfixiert | | | MS stärker als restl. Geißelumrisse, K schwarz |

HY 20-1/S119-6

- | | | | |
|---------------------------|--|--|---|
| 1) Tris-Saline + Methanol | | | schwach alle Umrisse |
| 4) NP40/2mM ME unfixiert | | | Umrisse von MS, ES, Kopfinneres diffus grün |
| 5) NP40/10mM ME unfixiert | | | MS stärker als ES, K und HS schwarz |

Ascites 38-4/1

- | | | | |
|---------------------------|----------------|-----------|--|
| 1) Tris-Saline + Methanol | Gesamt | 13 mg/ml | negativ |
| | pH 2.3 | (konz.) | alle Umrisse, Kopfinneres grün gefleckt |
| 2) Tris-Saline unfixiert | nicht getestet | | |
| 3) NP40/2mM ME + Methanol | Gesamt | 13 mg/ml | stark alle Umrisse, Kopfinneres diffus grün |
| | | 2.3 mg/ml | stark alle Umrisse, HS etwas schwächer |
| 4) NP40/2mM ME unfixiert | Gesamt | 39 mg/ml | alle Umrisse, Kopfinneres diffus grün |
| | pH 8.6 | (konz.) | alle Umrisse |
| | pH 5.5 | (konz.) | alle Umrisse, bei Kopf und MS stärker, Kopfinneres gefleckt |
| | | 100 µg/ml | alle Umrisse außer HS, Kopfinneres z.T. diffus grün |
| | pH 4.3 | (konz.) | alle Umrisse, bei Kopf und MS stärker, Kopfinneres gefleckt |
| | | 100 µg/ml | alle Umrisse außer HS, Kopfinneres meist diffus grün |
| | pH 2.3 | (konz.) | alle Umrisse außer HS, ES schwächer als K und MS, Kopfinneres gefleckt |
| | | 7 µg/ml | wie bei pH 4.3, aber schwächer |

5) NP40/10mM ME	unfixiert Gesamt	39 mg/ml Verdünnungsreihe ab 8 mg/ml: wird schwächer (außer MS); K schließl. schwach, Gelblich schwach	alle Geißelumrisse, MS schwächer, stark fluoreszierendes Kopfineres! Gelblich schwach
	pH 8,6, 5,5 4,3, 2,3	0,3 mg/ml (konz.)	alle Geißelumrisse, bei den IgG-Fractionen HS schwächer, Kopf schwarz ebenso, MS deutlich stärker, bes. bei pH 2,3 und 4,3
Ascites 38-4/2			
1) Tris-Saline + Methanol	Gesamt	12 mg/ml	negativ
3) NP40/2mM ME + Methanol	Gesamt	12 mg/ml	schöne Umrisse, stärker bei Hals und HS
4) NP40/2mM ME	unfixiert Gesamt	50 mg/ml	alle Umrisse
		124 µg/ml	schöne Umrisse, HS schwächer, Kopfineres oft diffus grün
5) NP40/10mM ME	unfixiert Gesamt	50 mg/ml	alle Umrisse, HS stärker, K schwarz
HY 38-4/S123-A4			
1) Tris-Saline + Methanol	Ascites	17 mg/ml	schwach alle Umrisse, Kopfineres diffus grün
4) NP40/2mM ME	unfixiert HY		schwach alle Umrisse
	Ascites		schwach alle Umrisse
5) NP40/10mM ME	unfixiert Ascites	17 mg/ml	MS, schwach ES, K und HS schwarz
HY 103-2			
1) Tris-Saline + Methanol			Umrisse von K, MS, schwach ES, Kopfineres diffus grün
4) NP40/2mM ME	unfixiert		Umrisse von K, MS, Kopfineres diffus grün
5) NP40/10mM ME	unfixiert		deutlich MS

Blüthmann-HY 28.5F3 (anti-PGK-2)

1) Tris-Saline + Methanol	negativ	
2) Tris-Saline unfixiert		sehr schwach alle Umrisse
3) NP40/2mM ME + Methanol		schöne Umrisse
5) NP40/10mM ME unfixiert		alle Umrisse, MS und HS stärker, K schwarz

Blüthmann-HY 28.6B5 (anti-PGK-1 und -2)

1) Tris-Saline + Methanol	negativ	
2) Tris-Saline unfixiert	negativ	
3) NP40/2mM ME + Methanol		alle Umrisse
5) NP40/10mM ME unfixiert		Umrisse von MS stärker als ES, K schwarz

K = Kopf; MS = Mittelstück; HS = Hauptstück; ES = Endstück; (konz.) = 25 RK/ml anti-PGK-2 Reaktivität;

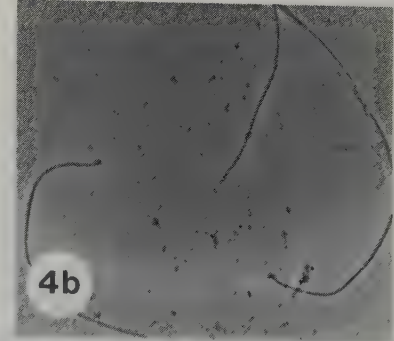
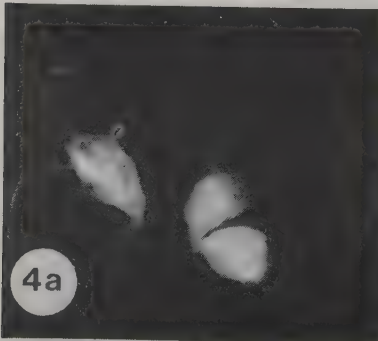
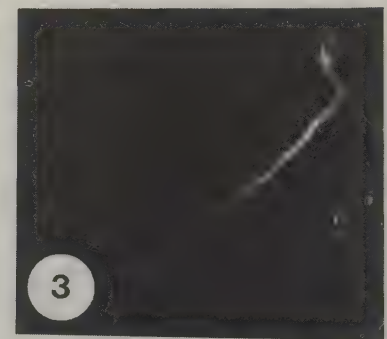
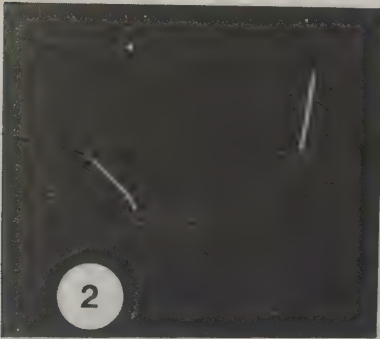
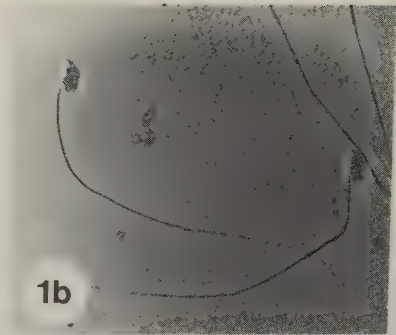


Abb. 16a: Immunfluoreszenz mit anti-PGK-2 Antikörpern und Mausspermien

Versuchstypen siehe Tab. 21! Der Maßstab zeigt 10 μm : 

1a) Versuchstyp 5; Maus-Kontrollplasma, pH 2.3 nach PAS (1.7 mg/ml)

1b) Phasenkontrastaufnahme zu 1a);

2) Versuchstyp 5 (gleicher Versuch wie bei 1a)); Ascites 38-4/A1, pH 2.3 nach PAS (1 mg/ml);

3) Versuchstyp 3; Ascites 20-1/A1-IgG (1.9 mg/ml)

4a) Versuchstyp 5; Ascites 38-4/A1 (39 mg/ml);

4b) Phasenkontrastaufnahme zu 4a);

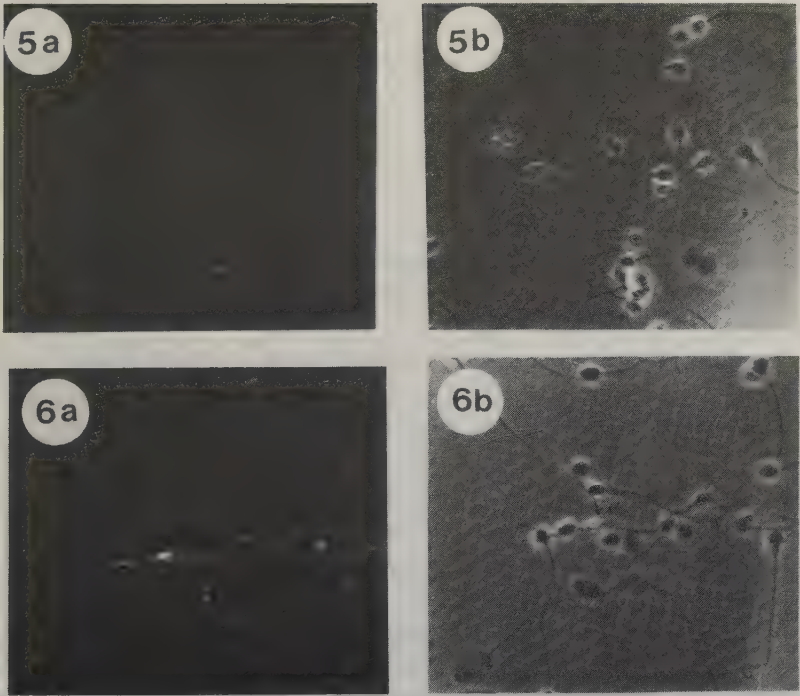


Abb. 16b: Immunfluoreszenz mit anti-PGK-2 Antikörpern und Humanspermien.

Versuchstypen siehe Tab. 21! Der Maßstab zeigt 10 μm : 

5a) Versuchstyp 5; Maus-Kontrollplasma, pH 2.3 nach PAS (1.7 mg/ml)

5b) Phasenkontrastaufnahme zu 5a);

6a) Versuchstyp 5 (gleicher Versuch wie bei 5a)); Ascites 38-4/A1,
pH 4.3 nach PAS (2 mg/ml));

6b) Phasenkontrastaufnahme zu 6a);

3.6.3 Kreuzreaktivität

Die im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen Versuche mit und ohne NP40/ME-Behandlung wurden an methanolfixierten und unfixierten PGK-2A- und -2B-Spermien durchgeführt, ebenso an unfixierten PGK-2C- und Humanspermatozoen. Bei den Präparaten der verschiedenen Mäusestämme ließen sich keinerlei Unterschiede hinsichtlich der in Tab. 21 aufgeführten Anfärbungsmuster feststellen. Nicht gequollene, methanolfixierte Humanspermien zeigten nur schwach diffuse Fluoreszenz. Die Vorbehandlung von Humanspermien mit NP40/10mM ME resultierte bei Puffer und Maus-Kontrollplasma, pH 2.3 IgG nach PAS (160 µg/ml) in ebenfalls schwacher, diffuser Fluoreszenz. Die Antikörperproben färbten stärker an, alle jedoch nach dem gleichen Muster, d.h. am intensivsten am Hals und am gesamten Schwanzteil (vgl. Abb. 15), am Mittelstück und Kopf höchstens schwach diffus.

In Abb. 17 werden die Resultate eines ELISA's mit Spermien-PGK aus Maus, Rind und Mensch illustriert. Die Antikörper sind mit Sicherheit nicht speziesspezifisch. Auffällig ist hierbei die große Reaktivität mit PGK-2C, die ja eine im Vergleich zu den beiden anderen Allozymen weitaus geringere spezifische Aktivität besitzt. Berechnet man aus der PGK-Aktivität pro 10^6 Spermien und der im ELISA eingesetzten PGK-Aktivität die theoretische Anzahl lysierter Spermien in 0.2 ml Beschichtungslösung, so resultieren für PGK-2A- und PGK-2B-Spermien die Werte 8×10^6 , bzw. 3×10^6 , für PGK-2C-Spermien dagegen nur 0.012×10^6 ! Die PGK einer erheblich geringeren Zahl an PGK-2C-Spermien führte also zu gleich hohen oder höheren ELISA-Extinktionen als bei Spermien der anderen beiden Allozymtypen, so daß PGK-2C in Spermatozoen in mindestens gleicher Menge vorliegen muß, selbst wenn der hohe Anteil an PGK-1B das Ergebnis beeinflußt haben mag.

Hemmtests mit 43 µg anti-PGK-2 Ascites und allen drei PGK-2-Spermientypen der Maus führten zu einer Verminderung der Enzymaktivität um 20% bei PGK-2A und 40% bei PGK-2C; keine Veränderung ergab sich bei PGK-2B, ebenso bei Verwendung von Ascites 20-1/2. Da die tatsächliche Proteinkonzentration der PGK hier jedoch unbekannt ist, läßt sich dieses Ergebnis nicht gut beurteilen.

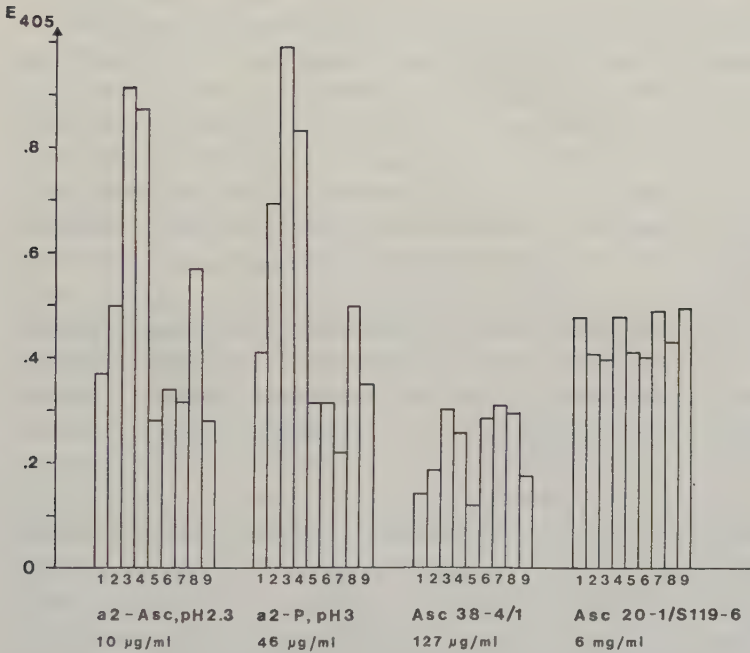


Abb. 17: Kreuzreaktivität poly- und monoklonaler Antikörper mit Spermienlysaten verschiedener Spezies.

Beschichtung der ELISA-Testplatte mit:

- 1) 2 µg/ml PGK-1A
- 2) 2 µg/ml PGK-1B
- 3) 2 µg/ml PGK-2A
- 4) 2 µg/ml PGK-2B
- 5) 1.8 U/ml Humanspermien-PGK ($13 \text{ mU}/10^6$ Spermien)
- 6) 1.9 U/ml Mausspermien-PGK-2A ($48 \text{ mU}/10^6$ Spermien; ca. 10% PGK-1B)
- 7) 0.6 U/ml Mausspermien-PGK-2B ($46 \text{ mU}/10^6$ Spermien; ca. 10% PGK-1A)
- 8) 0.014 U/ml Mausspermien-PGK-2C ($0.9 \text{ mU}/10^6$ Spermien; 76% PGK-1B)
- 9) 0.004 U/ml gereinigte Rinderspermien-PGK (2 µg/ml Protein), bzw. 1.25 mU/ml (2 µg/ml Protein) gereinigte Rinderhoden-PGK (gleiche Extinktionen)

3.6.4 Hodenschnitte

In Bouin-Lösung fixierte und in Paraffin eingebettete Schnitte aus PGK-2A-, PGK-2B- und PGK-2C-Hoden adulter Mäuse wurden, wie in Abschnitt 2.13.2 beschrieben, mit Antikörperproben und mit FITC-anti-Maus-IgG Antiserum inkubiert. Als negative Kontrollen dienten der Inkubations- und Waschpuffer Tris-Saline/5% FCS, Maus-Kontrollplasma (pH 2.3 Eluat nach PAS, 2.6 mg/ml) und anti-Maus-IgG (3 mg/ml). Als positive Kontrolle wurden die Kulturüberstände der Blüthmann-Hybridoma-linien 28.6B5 und 28.5F3 eingesetzt. Die Konzentration der zu testenden Antikörper betrug 1-50 mg/ml Protein mit jeweils ca. 25 µg/ml anti-PGK-2A Reaktivität.

Einzig die Referenzprobe 28.6B5 bewirkte eine deutliche Fluoreszenz der das Lumen der Hodenkanälchen umgebenden, innersten Spermatidschicht. Die Leydigischen Zwischenzellen fluoreszierten, wenn auch bedeutend schwächer, in jedem Fall, also auch nach Behandlung mit anti-Maus-IgG.

3.7 FIBROBLASTEN

Die Expression von PGK-1A und PGK-1B wurde an Fibroblastenkulturen aus der Milz von weiblichen C3H/Aa-Pgk-1^a/Pgk-1^b-Mäusen verfolgt. Diese Tiere entstammten C3H/Aa-Pgk-1^a X C3H/Aa-Pgk-1^b Kreuzungen und wurden nur verwendet, wenn ihre Erythrocyten ein Verhältnis von rund 50% PGK-1A zu 50% PGK-1B aufwiesen. Von jeder Milz wurden zwei parallele Primärkulturen auf je 21 cm² Wachstumsfläche angelegt (Plastikpetrischalen mit 6 cm Durchmesser). Nach 10-21 Tagen konnten die Zellen in kleine Kulturflaschen mit 25 cm² Wachstumsfläche überführt werden (Passage 0) und - sobald diese mit durchschnittlich 4×10^4 Zellen konfluent bewachsen waren - nach weiteren 4-7 Tagen in Kulturflaschen mit 75 cm² Wachstumsfläche (Passage 1). Von da an wurden die Zellen bei jeder Passage nach Möglichkeit so aufgeteilt, daß nach sieben Tagen das konfluente Stadium gerade erreicht war. Anfänglich war eine Aussaat von 5×10^5 Zellen erforderlich, später 2.5×10^5 Zellen und schließlich genügten 1×10^5 , in Einzelfällen auch nur 0.5×10^5 Zellen. Bei jeder Trypsinierung wurde auf quantitative Ablösung der Zellen und sorgfältige Suspendierung geachtet. Für die Weiterkultivierung nicht benötigte Zellen wurden lysiert und das prozentuale Verhältnis von PGK-1A und -1B im Extrakt elektrophoretisch untersucht. Bei diesem Verfahren genügen 0.1 U/ml PGK. Diese Menge wurde auch mit nur 1×10^5 lysierten Zellen leicht erreicht (1-3 U/ml).

Für die ersten Kulturen wurden neben Milzfibroblasten (M) auch solche aus dem Peritoneum (P) angelegt, wozu ein Stück Bauchfell mit einer Schere zerkleinert und wie in Abschnitt 2.14.1 beschrieben in Kultur genommen wurde. Die Populationsverdopplungen (PD) wurden anhand der Split Ratio bei den Passagen abgeschätzt. Da bei diesen ersten Kulturen erstaunlicherweise nach kurzer Zeit nur mehr einer der beiden PGK-Typen exprimiert wurde, und zwar PGK-1A in sieben von acht Kulturen, wurden weitere Linien aus Milzgewebe angelegt. Vier der in der zweiten Versuchsreihe verwendeten Mäuse (Nr. 6-9) entstammten einer Zucht, mit der versucht wurde, das von Johnston und Cattanaach (1981) postulierte Xce-Allel von Pgk-1^a-Mäusen mittels entsprechender Rückkreuzungen homozygot in Pgk-1-heterozygoten Mäusen zu etablieren. Das heißt, diese Mäuse besaßen den Genotyp $\text{Pgk-1}^a \text{ Xce}^c / \text{Pgk-1}^b \text{ Xce}^c$, während die Spender-tiere der Fibroblastenlinien 1-5 den Genotyp $\text{Pgk-1}^a \text{ Xce}^c / \text{Pgk-1}^b \text{ Xce}^a$ aufwiesen.

Die Fibroblasten der zweiten Versuchsreihe wurden bei jeder Passage in einer Neubauer-Zählkammer gezählt, sobald die Anwesenheit von Lymphocyten nicht mehr störte, die sich, infolge ihrer geringen Lebensdauer unter diesen Kulturbedingungen ohne Mitogen und ihrer Resistenz gegen die Trypsinablösung, sozusagen selbst eliminierten.

Anfangs- und Endergebnisse der ersten Versuchsreihe sind in Tab. 22 aufgeführt. Nur die Linie M2 enthielt am Ende ausschließlich Zellen mit PGK-1B Produktion, alle anderen Linien gingen allmählich auf reine PGK-Produktion über. Die Milzfibroblasten der Linie M1 zeigten eine stetige Abnahme des PGK-1B Anteils; bei den Passagen 14 und 15 (18.0-19.5 PD) ließ sich nur noch PGK-1A feststellen. Danach nahm PGK-1B zunächst wieder zu bis zu 77% (Passage 29; 50.2 PD), verminderte sich schließlich aber wiederum, bis die Linie bei Passage 36 (69.2 PD) mit 84% PGK-1A aus der Kultur genommen und eingefroren wurde. Einen ebenfalls schwankenden Verlauf der PGK-Anteile zeigte die Peritonealfibroblastenlinie P2 mit 100% PGK-1A bei Passage 7 (7.7 PD). Passage 8 (8.7 PD) und Passage 9 (9.7 PD) zeigten wieder 30%, bzw. 37% PGK-1B. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden von jeder Linie, die 100% eines PGK-Typs aufwies, noch mindestens fünf Passagen elektrophoretisch untersucht, bevor die 100%ige Expression als stabil angesehen wurde.

Tab. 23 zeigt die Anfangs- und Endwerte der zweiten Versuchsreihe (siehe auch Abb. 18!). Nur die Linien 5a und 7a wechselten zu ausschließlicher PGK-1B Produktion, allerdings nach einem Zwischenstadium mit erhöhtem PGK-1A Anteil. Die aus denselben Milzpräparaten 5 und 7 parallel angelegten Kulturen sowie alle anderen Linien wiesen schließlich nur noch PGK-1A produzierende Fibroblasten auf. Bei der Linie 6 stellte die ursprüngliche Parallelkultur 6b nach der 2. Passage das Wachstum ein, so daß die andere Kultur 6a bei der 3. Passage geteilt wurde. Die Parallelkulturen aller Linien verhielten sich bezüglich ihrer "Umstellung" auf nur ein PGK-Isozym in jedem Fall wie zwei völlig voneinander unabhängige Linien. Die Parallel-Linien von 6, 8 und 9 wiesen zwar jeweils nach der ungefähr gleichen Anzahl von Passagen nur noch einen PGK-Typ auf, die unterschiedlichen Werte für die jeweils erreichten Populationsverdopplungen verdeutlicht jedoch die unterschiedlichen Vermehrungsraten. Auffällig ist der zunächst parallele Kurvenverlauf bei der graphischen Auftragung (Abb. 18) von Vermehrungsrate (PD pro Tag), bzw. Prozent PGK-1A, gegen das Alter der Zellen (cumulative Populationsverdopplungen = CPD). Je größer der Anteil an PGK-1A exprimierenden Zellen, desto größer die

Tab. 22: PGK-1 Expression von Mausfibroblasten (Versuchsreihe 1)

Fibroblastenlinie	M1	P1	M2	P2	M3a	M3b	M4a	M4b
Erythrocyten-PGK	57% 1A, 43% 1B		52% 1A, 48% 1B		53% 1A, 47% 1B		58% 1A, 42% 1B	
erste Elektrophorese								
von PD	2.3	2.3	2.3	2.3	3.2	3.2	3.2	3.2
% PGK	64% 1A	71% 1A	52% 1A	75% 1A	54% 1A	100% 1A	62% 1A	63% 1A
nur ein PGK-Typ								
feststellbar ab PD	69.2	4.3	13.7	9.7	12.7	3.2	7.2	7.2
100% PGK	(84% 1A) ^a	1A	1B	(63% 1A) ^b	1A	1A	1A	1A

Milz (M)- oder Peritoneal (P)-Fibroblasten aus weiblichen C3H-Mäusen mit dem Genotyp $\text{Pgk-1}^a \text{ Xce}^c / \text{Pgk-1}^b \text{ Xce}^a$ wurden in Kultur genommen; von den Explantaten M3 und M4 wurden zwei parallele Linien angelegt. Die Ermittlung der Populationsverdopplungen (PD) erfolgte anhand der Split Ratio bei den Passagen. Von jeder Subkultur wurde der prozentuale Anteil an PGK-1A und PGK-1B im Extrakt überschüssiger, lysierter Zellen bestimmt.

^a bei 17.95 bis 19.45 PD mit 100% PGK-1A!

^b bei 7.7 PD mit 100% PGK-1A!

Tab. 23: PGK-1 Expression von Mausfibroblasten (Versuchsreihe 2)

Fibroblastenlinie	M5a	M5b	M6a	M6b	M7a	M7b	M8a	M8b	M9a	M9b
Erythrocyten-PGK	60% 1A, 40% 1B		48% 1A, 52% 1B		48% 1A, 53% 1B		40% 1A, 60% 1B		58% 1A, 42% 1B	
Zellzählung ab PD	2,8	2,8	1,8		1,8	1,8	0,2	0,2	0,2	0,2
erste Elektrophorese										
von PD	1,8	1,8	1,8	3,6	1,8	1,8	0,6	1,5	1,9	0,8
% PGK	57% 1A	79% 1A	57% 1A	57% 1A	53% 1A	44% 1A	66% 1A	100% 1A	42% 1A	38% 1A
nur ein PGK-Typ										
feststellbar ab PD	26,8	3,5	23,0	17,9	83,9	34,6	1,0	1,5	21,5	25,4
100% PGK	1B	1A	1A	1A	1B	1A	1A	1A	1A	1A

Aus Milzgewebe weiblicher C3H-Mäuse wurden je zwei Fibroblastenkulturen angelegt und bei jeder Passage der prozentuale Anteil an PGK-1A und PGK-1B im Extrakt überschüssiger Zellen bestimmt. Die Spendermaus Nr.5 besaß den gleichen Genotyp wie die Tiere der ersten Versuchsreihe (Tab. 22), die Mäuse Nr.6 bis Nr.9 dagegen den Genotyp PGK-1^a Xce^C / PGK-1^b Xce^C. Die Spendermäuse der Linien M8 und M9 entstammten verschiedenen Wurfen desselben Elternpaares. Die Fibroblasten der Linie M6 wurden erst bei der 3. Passage (nach 3,3 PD) in zwei Kulturen aufgeteilt. Die Berechnung der Anzahl an Populationsverdopplungen (PD) erfolgte mittels Zählung der ausgesäten und geernteten Zellen

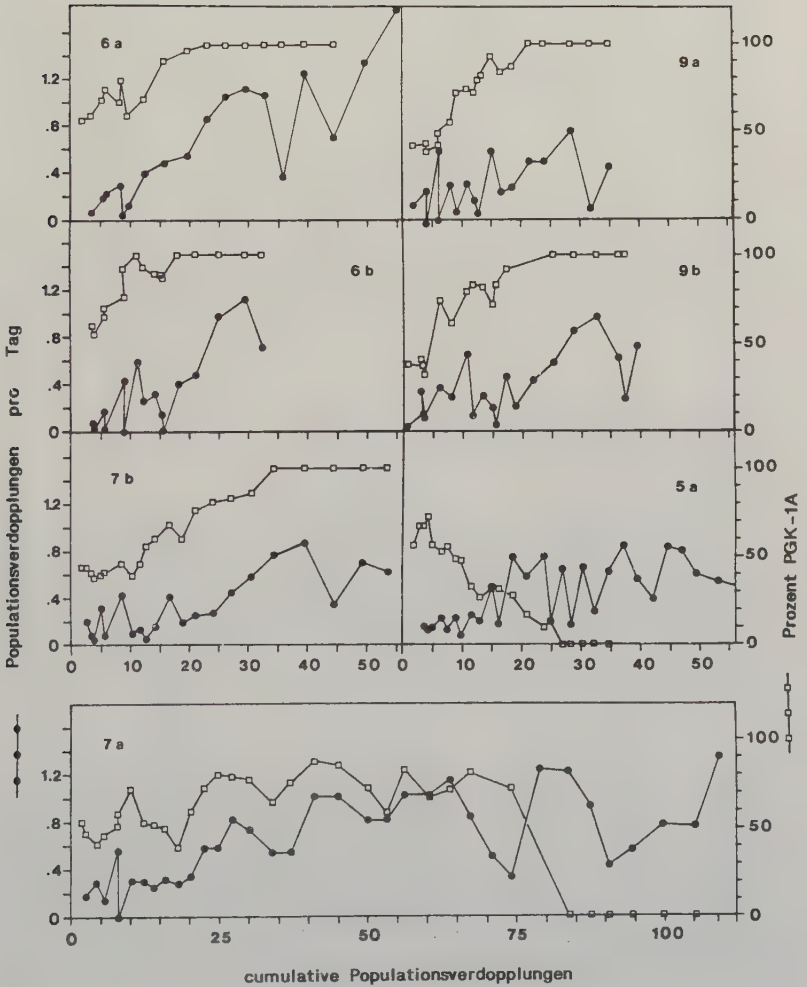


Abb. 18: Verlauf der Vermehrungsrate und der PGK-1A-Expression von Pgk-1^a/Pgk-1^b-Fibroblasten aus Mäusen (vgl. Tab. 23!).

Vermehrung der Gesamtpopulation.

Um die Möglichkeit zu prüfen, daß eine unterschiedliche Wachstumsrate der beiden Isoenzym-Zellpopulationen zu einer allmählichen Verdünnung meist der PGK-1B Zellen führt, wurde für eine reine PGK-1A Fibroblastenkultur die Milz einer männlichen C3H/Aa-Pgk-1^a-Maus angelegt, für reine PGK-1B Fibroblasten die einer männlichen C3H/Aa-Pgk-1^b-Maus. Nachdem beide Kulturen etabliert waren und gleiches Wachstum zeigten, wurden die Zellen zu gleichen Teilen vermischt. Alle drei Linien, FIB 1A, FIB 1B und FIB 1A/1B, wurden im folgenden völlig gleich behandelt, d.h. am gleichen Tag trypsiniert und die gleiche Anzahl von Zellen erneut ausgesät (Abb. 19, Tab. 24). Die reine PGK-1A Linie zeigte gegenüber der reinen PGK-1B Linie eine erhöhte Vermehrungsrate, ebenso die Mischlinie 1A/1B, bei der nach 29 Generationen nur noch PGK-1A nachzuweisen war.

Tab. 24: Wachstumsraten der Fibroblastenkulturen aus reinen PGK-1A-, bzw. PGK-1B-Mäusen

Tage in Kultur	FIB 1A		FIB 1B		FIB 1A/1B		
	CPD	PD/Tag	CPD	PD/Tag	CPD	PD/Tag	% PGK-1A
115	1.6	0.20	1.6	0.20	0.9	0.12	39
121	2.6	0.17	3.2	0.26	3.5	0.43	34
125	4.2	0.41	5.0	0.46	5.1	0.41	35
129	5.4	0.29	6.9	0.47	7.3	0.54	20
136	7.8	0.34	7.9	0.14	8.9	0.23	26
143	11.0	0.47	9.3	0.21	11.9	0.43	40
149	14.0	0.50	11.9	0.43	17.2	0.88	81
154	17.0	0.59	14.4	0.49	22.8	1.40	94
160/163/157	21.1	0.68	17.1	0.30	28.8	1.50	100

Am 107. Kulturtag wurden PGK-1A Zellen (10,1 CPD) und PGK-1B Zellen (8,7 CPD) zu gleichen Teilen gemischt und bei jeder Passage der prozentuale Anteil an exprimierter PGK-1A im Extrakt lysierter Zellen aus dieser PGK-1A/1B Mischkultur bestimmt.

PD = Populationsverdopplungen

CPD = cumulative Populationsverdopplungen ab Mischungstag

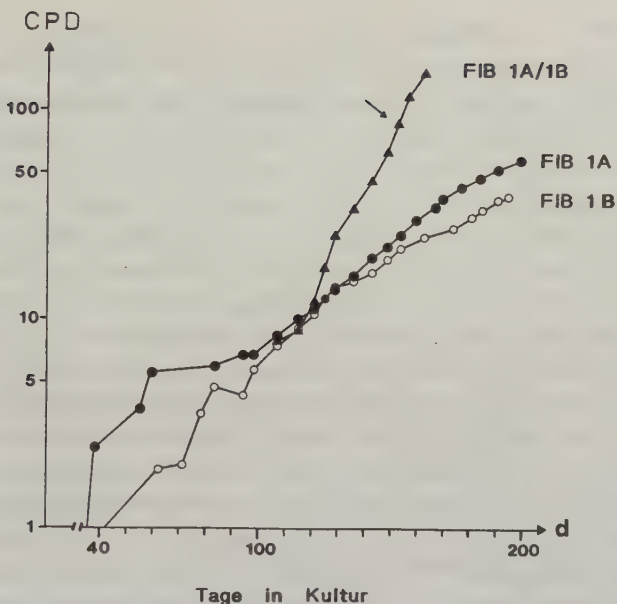


Abb. 19: Cumulative Populationsverdopplungen von reinen Pgk-1^a- und reinen Pgk-1^b-Fibroblasten und der daraus angelegten Mischkultur. Nach 42 Tagen wies diese nur noch PGK-1A exprimierende Zellen auf (vgl. Tab. 24!).

Die Linien 3a, 5b, 6a, 8a und auch FIB 1A/1B wiesen nach 4-13 Verdopplungen nur noch relativ kleine Zellen auf (Wachstumsfläche dividiert durch Zellzahl bei Konfluenz = 0.05 bis 0.1 μm^2), gefolgt von einer deutlich erhöhten Wachstumsrate (1-2 Verdopplungen pro Tag). Bei allen anderen Linien blieb die fibroblastenähnliche Morphologie und Größe erhalten (0.5-1.5 μm^2 ; ca. 0.2-0.8 Verdopplungen pro Tag). Die Änderung der Zellgröße fand bei 6a und FIB 1A/1B ungefähr zu derselben Zeit statt wie der definitive Anstieg des PGK-1A Anteils, während die Kulturen 5b und 8a sich bereits ausschließlich aus PGK-1A Zellen zusammensetzten.

Die Linie 6a wies gegenüber den anderen Kulturen weitere Besonderheiten auf. Wurden die Zellen bei Konfluenz nicht subkultiviert, so starben sie nicht ab, sondern wanderten in eine Ecke der Kulturflasche und wuchsen von dort wie aus einem Gewebestück erneut aus. Beim Transfor-

maionstest mit Weichagar zerfielen sie nicht wie die anderen zum Vergleich getesteten Linien, zeigten aber auch kein Wachstum. Nach 155 Populationsverdopplungen starb die ständig in Kultur gehaltene Linie ab, konnte also nicht etabliert werden. Es existieren jedoch noch eingefrorene Zellen aus früheren Passagen.

Karyogramme lieferten keinerlei Unterschiede zwischen den beiden Zellgrößengruppen bezüglich der Chromosomenzahl, wobei Metaphaseplatten von 6a vor und nach der Änderung im morphologischen Erscheinungsbild ausgezählt wurden. Alle bewegten sich mit 41-128 Chromosomen (Modus 65) im Rahmen der üblichen Aneuploidie von Mauszellen, die sich längere Zeit in Kultur befinden. Eine Chromosomenkartierung wurde nicht vorgenommen.

Die Kulturen 5a (nur PGK-1B), 6a (nur PGK-1A) und 7a (78% PGK-1A, 22% PGK-1B) wurden 24 h mit 10 μ M 5-Azacytidin im Kulturmedium behandelt und daraufhin in je 15 wells einer 48-well-Platte mit einer Zelldichte von 1700 Zellen/well (5a, 7a) und 4500 Zellen/well (6a) ausgesät. Bei 5a und 6a konnte keine erneute PGK-1A, bzw. -1B Produktion gemessen werden, was eine Reaktivierung des zweiten X-Chromosoms bedeutet hätte. Eine Probe von 7a jedoch produzierte 100% PGK-1B, die anderen acht angewachsenen Proben zeigten einen erhöhten Anteil an PGK-1B (37-59%) im Vergleich zur ursprünglichen Kultur, die immer noch 80% PGK-1A aufwies.

4. DISKUSSION

4.1 Physikalische und chemische Eigenschaften

In Tab. 25 sind die Daten aller mit der gleichen Methodik untersuchten Eigenschaften von PGK-1A, -1B, -2A und -2B zusammengefaßt. Keine Unterschiede bestehen hinsichtlich Molekulargewicht, Aktivierungsenergie, Temperaturoptimum, Zahl der Sulfhydrylgruppen, Abhängigkeit der Aktivität von der Ionenkonzentration und Hemmung mit Adipoyldihydrazo-ATP.

Vollständig reaktivierte Maus-PGK-1 weist normalerweise zwei schnell und fünf langsam mit DTNB reagierende SH-Gruppen auf. (Mühlbacher et al., 1983). Da bereits die Oxidation einer der beiden schnellen Gruppen zu einem Aktivitätsverlust von mehr als 50% führt, und die in dieser Arbeit eingesetzten PGK-Proben eine stark verminderte spezifische Aktivität aufwiesen, dürfte eine bereits zu Testbeginn vorliegende, teilweise Denaturierung die niedrigen Meßwerte verursacht haben. Unter diesen Bedingungen ergab sich für spermien-spezifische PGK-2 die gleiche Anzahl von SH-Gruppen. Jedoch erweist sich PGK-2 bei der Präparation aus Maushoden als noch empfindlicher gegen Oxidation als das somatische Isozym und muß daher bereits im Rohextrakt mit 0.2 mM DTE (Grounds, 1980) stabilisiert werden. Die spezifische Aktivität der ja ebenfalls vorhandenen PGK-1 läßt sich dadurch auf bis zu 1000 U/mg steigern (Obermaier, 1984). Auch die irreversible, lagerungsbedingte Inaktivierung betrifft am stärksten PGK-2 mit ca. 60-70% Aktivitätsverlust, gefolgt von PGK-1A, während PGK-1B mit ca. 30% Verlust relativ stabil bleibt (keine systematisch gesammelten Daten).

Die spezifische Aktivität von PGK-2A und -2B liegt nach der optimalen Präparation bei 400 U/mg (Obermaier, 1984). Für PGK-2C wurde trotz Stabilisierung mit DTE eine spezifische Aktivität von nur 8.5 U/mg ermittelt (Zusammenfassung der Daten in Lee et al., 1980). In dieser Studie zeigten Doppelimmundiffusionen mit Kaninchen-Antisera gegen Maus-PGK vergleichbare Antigenkonzentrationen an PGK-2A und -2C in Hodenextrakten entsprechender Mäusestämme, so daß die extrem niedrige PGK-2C-Aktivität wohl eher auf einem strukturellen Unterschied am aktiven Zentrum als auf einer regulatorischen Genmutation beruht. Das Ergebnis der vergleichenden ELISA-Bestimmung mit Lysaten von PGK-2A-, -2B- und -2C-Spermien (Abb. 17) steht mit dieser Vermutung in Einklang, da die Antikörper in hohem Maße an PGK-2C banden, so daß dieses Allozym quantitativ in mindestens gleichem Maße in Spermatozoen enthal-

ten sein muß.

PGK-2A erwies sich bei Inkubation bei 49°C, pH 7.6 als labiler als PGK-2B und -1B (Abb. 2). Ohne Stabilisierung mit BSA ergaben sich Werte in der gleichen Größenordnung wie bei Mühlbacher et al. (1983) für PGK-1A und -1B; hier war die 50-100fache Menge an PGK ohne BSA eingesetzt worden. Mit einer leicht veränderten Bestimmungsmethode gelangten Lee et al. (1980) zu dem gleichen Resultat, wobei PGK-2C eine noch geringere Thermostabilität als PGK-2A zeigte.

Im Vergleich zu PGK-1 scheint die pH-Stabilität der PGK-2-Formen leicht zum alkalischen Bereich hin verschoben; das pH-Optimum für die PGK-2-Aktivität ist schärfer um pH 6 begrenzt als bei PGK-2A und -1 (Obermaier, 1984). Ein deutlicher Unterschied bezüglich der Ladungseigenschaften wird in den isoelektrischen Punkten sichtbar (Lee et al., 1980), wie er ja auch bei der Identifizierung der Iso- und Allozyme in der Cellogelelektrophorese (Bücher et al., 1980) zum Ausdruck kommt (vgl. Abb. 14!).

Tab. 25: Zusammenfassung physikalischer und biochemischer Eigenschaften der PGK-Iso- und -Allozyme

	PGK-1A Mühlbacher et al., 1983	PGK-1B	PGK-1B	PGK-2A	PGK-2B
			eigene Werte Obermaier, 1984 (*)		
Molekulargewicht	47000 ± 1000		46000 ± 1000		
SDS-PAGE	Monomer (eine Bande)				
Absorption bei 280 nm ($E_{1\text{ cm}}^{0.1\%}$)	0.714	0.706	-	-	-
Thermostabilität bei 49°C, pH 7.6 ($t_{1/2}$ min)	8.5/36	14/33	9.2/97	1.5/172	5.2/107
Temperaturoptimum (°K)	311 - 316		312 - 319		
pH-Stabilität (24 h, 4°C)	pH 5.0 - 8.5		pH 7.0 - 9.5		
pH-Optimum	pH 6.0 - 9.0		pH 6-8	pH 6-8	pH 6
optimale Ionenstärke, pH 7.6	0.15 M NaCl		0.10 M NaCl		
Aktivierungsenergie (kJ/Mol Substrat)	39.3	37.8	37.9	37.0	37.0
spezifische Aktivität, 25°C (U/mg)	660	750	710	410	410
Sulphydrylgruppen (Mol SH/Mol PGK)	6.7	6.9	4.8	4.6	5.2
K_i für Adipoyldihydrazo-ATP (µM)	18.2	15.4	26	33	28
scheinbare Michaeliskonstanten	siehe Tab. 25!				
Nucleotidspezifität	siehe Tab. 26!				
Isoelektrische Fokussierung (pI) nach Lee et al., 1980			7.9	5.0	5.1

Bei PGK-2C beträgt die spezifische Aktivität 8.5 U/mg, der pI liegt bei 4.9 (Lee et al., 1980).

Die scheinbaren Michaeliskonstanten bewegen sich für PGK-1A, -1B, -2A und -2B in gleichen Größenordnungen mit der größten Substrataffinität für 1,3-BPG (Tab. 26). Einzelheiten zum Reaktionsmechanismus, die auch für Maus-PGK zutreffen dürften, sind ausführlich in einem Artikel von Blake und Rice (1981) beschrieben. Nur PGK-2C zeigt erheblich höhere Affinitäten zu ADP, ATP und 3-PG (Lee et al., 1980), für 1,3-BPG dürfte sich ein entsprechend niedrigerer K_m -Wert ergeben.

Tab. 26: Michaeliskonstanten (mM) von Maus-PGK im Vergleich mit der Literatur

	Ref.	1,3-BPG	ADP	3-PG	ATP-Mg
PGK-1A	1)	0.0025	0.11	0.65 / 2.20	0.43 / 0.80
PGK-1B	1)	0.0024	0.11	0.78 / 2.10	0.42 / 0.96
	2)	-	-	0.75 / 2.09	0.49 / 0.70
	3)	0.0028	0.18	0.54 / 3.08	0.35 / -
	4)	-	0.23	- / 0.96	0.22 / -
PGK-2A	2)	-	-	2.25	0.91
	3)	0.0041	0.41	0.70 / 1.60	0.49 / -
	4)	-	0.15	0.21 / 0.70	0.42 / -
PGK-2B	2)	-	-	0.85	0.81
	3)	0.004	0.39	0.39 / 1.78	0.36 / -
	4)	-	0.19	0.15 / 0.40	0.37 / -
PGK-2C	4)	-	0.039	0.028/0.40	0.038/ -

Die Werte entstammen 1) Mühlbacher et al., 1983, 2) Obermaier, 1984, 3) dieser Arbeit und 4) Lee et al., 1980. Bei 3-PG und ATP resultieren jeweils zwei Werte aufgrund der biphasischen Kinetik im Lineweaver-Burck-Diagramm; die zweite Zahl gilt für hohe Substratkonzentrationen ($4 < \text{mM}$ 3-PG; $3 < \text{mM}$ ATP).

Alle hier untersuchten PGK-Typen besitzen die größte Spezifität für ATP, gefolgt von ITP und GTP (Tab. 27). Desoxy-Purinnucleotide werden von PGK-2A und -2B ebenso wie Pyrimidinnucleotide nur geringfügig umgesetzt, während PGK-1 auch dGTP und dATP in geringem Maße als Phosphatdonor nutzen kann. PGK-2C zeigt laut Lee et al. (1980) mit dATP die volle und mit UTP noch eine beträchtliche Aktivität.

Tab. 27: Relative PGK-Aktivität (%) mit verschiedenen Nucleotiden im Vergleich mit der Literatur

	Ref.	ATP	ITP	GTP	dGTP	dATP	UTP	dITP	ATPP	CTP
PGK-1A	1)	100	68	53	22	15	10	2	3	0
	2)	100	47	43	14	12	7	3	-	0
PGK-1B	1)	100	67	55	21	16	7	3	2	0
	2)	100	54	44	25	12	6	5	-	0
	3)	100	-	75	-	3	1	-	-	1
PGK-2A	2)	100	33	56	7	4	4	1	-	0
	3)	100	-	93	-	7	3	-	-	3
PGK-2B	2)	100	42	64	9	6	7	1	-	0
	3)	100	-	94	-	7	4	-	-	4
PGK-2C	3)	100	-	20	-	119	58	-	-	16

Die Werte entstammen 1) Mühlbacher et al., 1983, 2) eigenen Versuchen und 3) Lee et al., 1980.

4.2 Fertilitätskontrolle

Eine signifikante immunologische Beeinträchtigung der Fertilität über reproduktionsspezifische Antigene dient als praktische Grundlage für kontrazeptive Ansätze (Goldberg, 1979). Das am intensivsten untersuchte und bisher einzig erfolgversprechende Modell stellt das Spermienisozym LDH-C₄ dar, trotz seiner intrazellulären Lokalisation. Die Fertilität und die Anzahl der Schwangerschaften bei Mäusen und Kaninchen ließen sich durch aktive und passive Immunisierung mit LDH-C₄ reduzieren (vgl. Wheat und Goldberg, 1983). Immunhistochemische Untersuchungen von Goldberg und Mitarbeitern ergaben, daß die Zona pellucida, die innere Zonamembran und der perivitelline Raum von Blastocysten anti-LDH-C₄ Antikörper binden, nach Vermutung der Autoren infolge des Zerfalls überzähliger Spermatozoen, was die toxischen Wirkungen auf Embryos vor der Implantation erklären würde (Bené und Goldberg, 1974; Lerum und Goldberg, 1974). Erickson und seine Gruppe konnten dagegen nach passiver Immunisierung von Mäusen mit gegen LDH-C₄ gerichtetem Antiserum aus Kaninchen keinerlei embryopathische Wirkungen feststellen (Erickson et al., 1975b). Präimplantationsembryos aus Mäusen wiesen keine LDH-Aktivität auf, und Studien mit anti-LDH-C₄ IgG, mittels Affinitätschromatographie gereinigt, lieferte keine Bestätigung für Bindungsstellen in oder an

der Zona pellucida oder im perivitellinen Raum (Spielmann et al., 1977). Die Verminderung der Fertilität durch Antisera gegen LDH-C₄ läßt sich eher durch humorale immunologische Einwirkungen auf Spermatozoen als durch Embryotoxizität erklären (Erickson et al., 1975a, b), da LDH-C₄ aus beschädigten Spermien, die sich an die Außenmembran intakter Spermien lagert (Erickson et al., 1975c), als Bindungsstelle für spezifische Antikörper des weiblichen Fortpflanzungstraktes dienen könnte (Kille und Goldberg, 1980). Eine weitere Möglichkeit ergäbe sich nach dem Befund, daß das Enzym aus dem Mittelstück zur Membran diffundiert und dort eingelagert wird, so daß es dort einen Angriffspunkt für Antikörper und Komplement bietet (Goldberg, 1979).

Nur wenige Untersuchungen befaßten sich bisher mit spermienspezifischer PGK-2 und ihren möglichen Auswirkungen auf die Fortpflanzung, wie es die geringe enzymatische Aktivität von PGK-2C und die niedrige Vermehrungsrate von Pgk-2^C Mäusestämmen nahelegen (VandeBerg, 1977). Rekombinanten von Stämmen mit hoher und niedriger PGK-Aktivität in Spermien ergaben allerdings keine Korrelation zwischen PGK-Alleltyp und durchschnittlicher Wurfgröße (Erickson und Harper, 1981), so daß hier wohl andere genetische Faktoren in Betracht gezogen werden müssen. Mit Kaninchen-Antisera gegen Maus-PGK-2 ließ sich die in vitro Befruchtung von zona-freien Hamstereiern durch Mäusespermien trotz Agglutination der Spermatozoen nicht hemmen (Erickson et al., 1979). Agglutination ist jedoch nicht unbedingt ein sicheres Kriterium für inhibitorische Effekte (Rose et al., 1976; Dor et al., 1981) und eine geringe in vitro Fertilitätsrate nicht unbedingt ein Indiz für gleiche in vivo Verhältnisse (Carey und Olds-Clarke, 1980).

Mit einem homologen System wurde in dieser Arbeit versucht, Maus-Antikörper gegen spermienspezifische Maus-PGK zu erzeugen, um die Fertilität in vivo zu hemmen. Die anti-PGK Reaktivität der Plasmaproben wurde mittels Sandwich-ELISA bestimmt (Engvall, 1980): mit an Mikrotiterplatten adsorbierter PGK, Inkubation mit Antikörper und einem Konjugat aus anti-Maus-IgG und Alkalischer Phosphatase. Plasma ungeimpfter Mäuse führte zu keiner erhöhten Extinktion bei 405 nm. Für semiquantitative Bestimmungen wurden Maus-IgG-Referenzkonzentrationen zum Vergleich herangezogen ($\mu\text{g/ml}$ Maus-IgG = RK/ml anti-PGK Reaktivität), da keine reinen Antikörper gegen PGK zur Verfügung standen.

PGK-2A und PGK-2B erwiesen sich sowohl in weiblichen wie auch in männlichen Mäusen als immunogen, riefen jedoch individuell sehr unter-

schiedliche Antikörpertiter hervor (Abb. 8, 9). Die bei NMRI-Mäusen im Vergleich zu C3H/Aa-Tieren wesentlich höheren Antikörpertiter weisen zudem auf stamnesspezifische Unterschiede bei der Immunreaktion hin. Eine solche stammbegogene und individuelle Variabilität auch bei Inzuchtstämmen wurde ebenso von anderen Gruppen beobachtet (Kille et al., 1978; Stähli et al., 1983). Am Beispiel der LDH, deren Isozyme sich immunologisch gut unterscheiden lassen, wurde festgestellt, daß mindestens zwei I_r-Genloci des H-2-Komplexes die Immunantwort auf somatische LDH vom Schwein kontrollieren (Melchers und Rajewski, 1976), während die Kinetik der Immunreaktion auf LDH-C₄ der Maus X-chromosomal und unabhängig vom Haplotyp beeinflusst wird (Marsh et al., 1981). Angesichts dieser Komplexität und da der genetische Status der NMRI- und C3H-Mäuse hinsichtlich der Haplotypen nicht näher bekannt war, lassen sich bezüglich der individuellen Titerunterschiede keine Schlußfolgerungen ziehen.

Die Befunde nach der Verpaarung zeigen, daß die Immunantwort auf spermienpezifische PGK-2 die Befruchtung und Lebensfähigkeit der Embryos nicht beeinflusst. Hinsichtlich der Wurfgröße und des Geschlechterverhältnisses unter den Geschwistern konnte keine Änderung bei den Nachkommen immunisierter Mäuse gegenüber nicht immunisierten Tieren des jeweiligen Stammes festgestellt werden (Tab. 8). Zwischen der Wurfgröße und dem Antikörpertiter im Plasma bestand ganz offensichtlich kein Zusammenhang (Tab. 6, 7, 8). Eine Wechselwirkung zwischen den hier erzeugten Antikörpern gegen PGK-2 und Spermien *in vivo* ist daher unwahrscheinlich. Zwar beruhen die Ergebnisse auf sehr kleinen Stichproben, ein brauchbarer Effekt, also eine deutlich beeinträchtigte Fertilität, hätte sich jedoch bereits hier zeigen müssen, zumindest in den Fällen mit relativ hohen Antikörperkonzentrationen um 1000 RK/ml Plasma. Die Umkehrung des Geschlechterverhältnisses bei NMRI-Mäusen ist derart geringfügig, daß dieser Aspekt dagegen nur bei einem erheblich größeren Stichprobenumfang eine sichere Aussage erlauben würde.

Impfungen von C3H/HeH-Pgk-1^a-, bzw. -Pgk-1^b-Mäusen mit PGK-1B, bzw. PGK-1A führten zu keiner nennenswerten Antikörperbildung. Die Titer lagen nur knapp über den Werten von unbehandelten Tieren. Die somatische Enzymform wirkte hier also erwartungsgemäß, vermutlich infolge Immuntoleranz, nicht autoantigen. Für die Pgk-1^b-Mäuse ergaben sich nach als negativer Kontrolle dienender Verpaarung keine Änderungen bezüglich der Würfe im Vergleich zu unbehandelten Tieren.

4.3 Antikörper gegen PGK

Erstaunlich ist die Kreuzreaktivität der gepoolten und über Protein A-Sepharose chromatographierten Antisera aus den Fertilitätsversuchen (Tab. 5, Abb. 11): anti-PGK-1 Sera reagierten, insbesondere im Fall des anti-PGK-1A-IgG's, noch stärker mit PGK-2, sowie anti-PGK-2-Sera mit PGK-1. Daß die auch die somatische PGK-1 bindenden zirkulierenden Antikörper zu keinerlei physiologischen Auswirkungen führen, kann an der unzugänglichen Lokalisation des Enzyms im Cytoplasma von Somazellen liegen. Von anderen Arbeitsgruppen wurde bisher mit unterschiedlichem Erfolg versucht, auf traditionellem Wege Antisera gegen PGK zu erzeugen (Chen et al., 1976; Mühlbacher, 1980; Singer-Sam et al., 1983). Die detailliertesten Studien wurden von Lee et al. (1980) mit Kaninchenantisera gegen Maus-PGK-1 und -2A durchgeführt, die beide mit dem jeweils anderen Isozym kreuzreagierten. Absorption mit Leberhomogenat eliminierte die Kreuzreaktivität mit der somatischen PGK, Inkubation mit PGK-2 diejenige mit der spermienspezifischen PGK (VandeBerg et al., 1981; Kramer, 1981). Die PGK-2-Allozyme ließen sich mit den entsprechenden Antikörpern nicht unterscheiden.

Auch die hier erzeugten polyklonalen anti-PGK-2A und anti-PGK-2B Ascites, sowie die monoklonalen Hybridomaantikörper reagierten mit allen vier untersuchten PGK-Varianten, beide stärker mit PGK-2, aber auch mit PGK-1. Die Kreuzreaktivität ließ sich mit durch Glutardialdehyd vernetzter PGK-1 nicht abtrennen. Protein A-Sepharose (PAS) Chromatographie poly- und monoklonaler Ascites führte zu einer Anreicherung der anti-PGK Reaktivität im pH 2.3 Eluat (IgG2b, 1). Jedoch enthielt auch der Durchlauf bei pH 8.0 noch anti-PGK Reaktivität, ebenso alle Fraktionen bei stufenweiser Elution mit unterschiedlichem pH, wobei allerdings beim Plasma-Pool das pH 6.0 Eluat (IgG1), bei den monoklonalen Antikörpern das pH 2.3 Eluat (IgG2, 1) den höchsten Anteil aufwies. Infolgedessen ergaben sich bei den Hybridomakulturüberständen solche Verluste an Reaktivität, die im ELISA nur für PGK-2 gerade noch erfaßbar war, daß die Anreicherung mit PAS-Chromatographie hier nicht weiter verwendet wurde. Die nach Ey et al. (1978) mit PAS mögliche Auftrennung in die einzelnen Subklassen konnte laut Immundoppeldiffusion der Eluate gegen subklassenspezifische Antisera in keinem Fall erreicht wurde. Auch Seppälä et al. (1981) beschrieben eine erhebliche Verunreinigung der verschiedenen pH-Eluate mit allen Subklassen und je nach Igh-Allotyp unterschiedliche Elutionsprofile sowie nicht eindeutige Spezifität von subklassenspezifischen

Antisera. Da das Ergebnis der Maus-IgG-Bestimmung der PAS-Proben mittels ELISA beträchtlich unter dem E_{280} -Wert für Maus-IgG lag, wurde weiterhin das kommerziell erhältliche Maus-IgG als Referenz für semi-quantitative Bestimmungen verwendet. Nur im Falle des Ascites 20-1/A1-IgG und des anti-PGK-2 Ascites-IgG stimmten die beiden Bestimmungen überein.

Kompetitive ELISA-Versuche bestätigten den Verdacht, daß sich die von den monoklonalen Antikörpern erkannten Epitope sowohl auf PGK-2 wie auch auf PGK-1 befinden, wobei sie bei gelöster PGK-1 weniger zugänglich zu sein scheinen als bei PGK-2 und angehefteter PGK-1. Nur die Antikörper der Hybridomazellen 65-1, mit im ELISA größter Bindung an PGK-1B, führten zum umgekehrten Ergebnis, also in geringerem Maß erreichbare Determinanten auf PGK-2. Durch die monoklonalen, jedoch nicht durch polyklonale Antikörper, konnte die Enzymaktivität gehemmt werden, meist stärker die der PGK-2, auch bei Verwendung von 65-1. Möglicherweise sind die Epitope bei PGK-2 aufgrund deren generell größerer Instabilität leichter erreichbar; da jedoch PGK-2 ebenso wie PGK-1 in Abwesenheit der Antikörper nicht an Aktivität verlor, müssen die Determinanten auch beim nativen Spermienenzym zugänglicher sein als bei PGK-1.

Zwei weitere Arbeitsgruppen versuchten, mit von uns isolierten PGK-1-Allozymen monoklonale Antikörper mit Monospezifität für PGK-1A oder -1B zu erzeugen. H.S. Micklem (persönliche Mitteilung) immunisierte Ratten zur Fusion der Milzzellen mit Myeloma, um Stadien der Differenzierung hämatopoietischer Stammzellen zu untersuchen. L. Bolund (persönliche Mitteilung) benötigte monospezifische Maus-Antikörper für Studien der X-chromosomalen Differenzierung während der Embryogenese und der klonalen Entwicklung verschiedener Gewebe. Bei beiden Ansätzen ließ sich die Kreuzreaktivität mit beiden Allozymen nicht verhindern. Auch Bolund fand zahlreiche Hybridomaklone, die sich jedoch als instabil erwiesen, und deren Antikörper geringe Affinität zu PGK-1 zeigten. Immunfluoreszenzversuche blieben erfolglos. Die Hybridomazellen proliferierten nach automatischer Klonierung mit einem Fluoreszenz-aktivierten Zellsorter (FACS II) nicht mehr; verschiedene Impfschemata, wie Emulgierung in inkomplettem Freundschens Adjuvans oder weniger als 50 µg Antigen, zur Umgehung eventueller low-zone-Toleranz und Erhöhung der Antikörperaffinität brachten keine Verbesserung. Der einzige Hybridomaklon der vorliegenden Arbeit, HY 65-1, der größte Affinität zu PGK-1B zeigte, konnte leider

nicht erhalten werden.

Zwar zeigte eine Peptidanalyse von PGK-1 und -2 nur geringe Homologie (Lee et al., 1980), die Aminosäuren-Zusammensetzung der bisher untersuchten PGK-Formen verschiedener Spezies weist jedoch einen hohen Konservierungsgrad auf (Zusammenstellung in VandeBerg, 1985). Offenbar ähneln sich die Iso- und Allozyme trotz ihrer Ladungsunterschiede so stark, daß die Erzeugung monoklonaler, monospezifischer Antikörper mit den üblicherweise erfolgreichen Methoden aussichtslos erscheint. Eine weitere Schwierigkeit ergibt sich aus der je nach Testsystem und Antigenpräsentation unterschiedlichen Bindung der Antikörper. Ein im ELISA oder RIA positiver Antikörper reagiert z.B. nicht unbedingt auch bei Immunfluoreszenzanfärbung und vice versa (Blüthmann, bzw. Bolund, persönliche Mitteilung), wie auch die Ergebnisse beim kompetitiven ELISA mit gelöster und immobilisierter PGK-1 andeuten.

4.4 Spermienimmunfluoreszenz

Für Immunfluoreszenzversuche mit anti-PGK Antikörpern wurden epidymale Spermatozoen adulter Mäuse verwendet, die sich von trotz der Waschungen in geringem Ausmaß noch vorhandenen Somazellen gut unterscheiden lassen und bei denen die Gefahr von Verunreinigungen durch Adsorption von Proteinen des Seminalplasmas ausgeschlossen ist. Die Präparation erfolgte möglichst schonend, um Anlagerung von PGK-2 aus beschädigten Spermatozoen an die Außenmembran möglichst zu vermeiden. Als Proben wurden die polyklonalen Antikörper aus Plasma und Ascites sowie monoklonale Antikörper mit der relativ geringsten Kreuzreaktivität mit PGK-1 eingesetzt (20-1 und 38-4). Die geringe Affinität der Antikörper dürfte eine unspezifische Anfärbung von PGK-1 weitgehend verhindert haben. Nur nach Quellung der Spermien mit Nonidet P40 und Mercaptoäthanol resultierte eine Fluoreszenz aller Umriss mit Ausnahme des Kopfes (Tab. 21), die auf eine Lokalisation der PGK-2 an der Membrinnenseite hinweist. Auch gelegentlich intensivere Färbung von Mittel-, Haupt- oder Endstück betraf nur die Membran. Für die Innenseite spricht auch die fehlgeschlagene Fertilitätsverminderung durch aktive Immunisierung, eine Stimulierung von T-Zellen trotz der Verwendung von komplettem Freundschem Adjuvans vorausgesetzt. Keine Unterschiede ergaben sich für Spermien aus Pgk-2^a-, Pgk-2^b- oder Pgk-2^c-Mäusen. Spermatozoen aus menschlichem Ejakulat fluoreszierten hauptsächlich am Hals und der gesamten Geißel. Erstaunlich ist die häufige diffuse Fluoreszenz des

Kopffinneren bei Maus-Spermatozoen, die bei der ersten Quell-Präparation besonders intensiv, jedoch nicht reproduzierbar mit 38-4/A1 und 20-1/A1-IgG auftrat. Abgesehen von schwacher Hintergrundfluoreszenz konnte mit bouinfixierten Hodenschnitten aller drei PGK-2-Typen keine Färbung erzielt werden. Ein qualitativer ELISA mit Spermienlysaten bestätigt die Kreuzreaktivität mit allen drei PGK-2-Alлотypen sowie PGK-2 von Mensch und Rind (Abb. 17). Wie bereits erwähnt waren die Extinktionswerte mit PGK-2C aus einer relativ wesentlich geringeren Anzahl lysierter Spermien unerwartet hoch.

Einzelheiten der Spermatogenese unter besonderer Berücksichtigung der Verhältnisse der Maus sind ausführlich in einigen Übersichtsartikeln beschrieben worden (Oakberg, 1956; Nebel et al., 1961; Bellvé et al., 1979; Erickson et al., 1981; VandeBerg, 1983). Laut elektrophoretischen und immunhistochemischen Untersuchungen mit Hodenextrakten und -schnitten setzt die PGK-2 Synthese bei Mäusen ca. 22 Tage nach der Geburt mit dem Auftreten der ersten Sparmatiden (Oakberg-Stadium 12), also nach der Meiose, ein. Spermatogonien und spätere Stadien wurden mit anti-PGK-1-Sera leicht angefärbt, eventuell infolge der erwähnten, doch nicht völlig beseitigten Kreuzreaktivität; keine Kreuzreaktivität trat dagegen mit poly- und monoklonalen Antikörpern gegen PGK-2 auf (Kramer, 1981; Kramer und Erickson, 1981; VandeBerg et al., 1981; Blüthmann et al., 1982). Eventuell kommt die anti-PGK-1 Reaktivität bei Verdünnung nicht mehr zum Ausdruck. Die Transkription des autosomalen Pgk-Gens beginnt in Pachytän-Spermatocyten und wird eventuell nach der Meiose fortgesetzt. Die prämeiotische mRNA für PGK-2 wird gespeichert, die Translation setzt erst in runden Spermatiden ein (Gold et al., 1983). Das X-Chromosom wird im Leptotän-Stadium inaktiviert (Monesi, 1978) und erst nach der Implantation am 6. Tag der Embryogenese wieder eingeschaltet (Krietsch et al., 1982). Bei Mäusestämmen mit definierten, mit Sterilität der Männchen korrelierenden Chromosomentranslokationen wurde eine in der späten Prophase wieder ansteigende PGK-1 Aktivität festgestellt, während die PGK-2 Aktivität auf ihrem niedrigen, durch Verunreinigung mit Zellen späterer Stadien bedingten, prämeiotischen Niveau verblieb (Hotta und Chandley, 1982). Dies unterstützt die These, daß die autosomale PGK das ab der Meiose nicht mehr synthetisierte X-chromosomale Isozym ersetzt und eine ausreichende glycolytische ATP-Produktion sicherstellt, insbesondere nach der Auftrennung in Einzelzellen. Bis zum Ende der Spermiogenese, der Reifung der Spermatiden zu

Spermatozoen, liegen die Keimzellen aufgrund unvollständiger Cytokinesen als Syncytien vor. Die Cytoplasmabrücken erlauben keine Passage von Mitochondrien und werden durch eine spezialisierte Membran aufrechterhalten, die eine laterale Diffusion von Zellmembranantigenen der Spermien verhindert. LDH-C₄, deren Kopplungsgruppe noch nicht ermittelt wurde, ist am mitochondrialen Stoffwechsel beteiligt, der primär zur Energiegewinnung für Ionentransportvorgänge bei der Kapazitierung beiträgt (Peterson, 1982). Die Glycolyse wird vor allem für die Motilität benötigt (vgl. die Unempfindlichkeit der Beweglichkeit gegen NaN₃!). Da der größte Teil des Cytoplasmas abgeschieden wird, und falls im reifen, haploiden Spermium keine Transkription stattfindet, wäre es durchaus denkbar, daß PGK-2 und andere Glycolyseenzyme an der Innenseite der Plasmamembran lokalisiert sind. Auch die Ladungsunterschiede zwischen PGK-2 und cytoplasmatischer PGK-1 weisen auf eine Assoziation des Spermienenzym mit einer strukturellen Komponente hin (VandeBerg, 1985), ebenso der Befund, daß unbewegliche und somit vermutlich schadhafte Humanspermatozoen wesentlich weniger PGK-2 als LDH-C₄ an das Seminalplasma abgeben (Vogel, 1985). Feinstrukturen ließen sich im Lichtmikroskop nicht erkennen. Bessere Ergebnisse müßten mittels Elektronenmikroskopie erzielt werden. Die Gentechnologie, mit deren Methoden die meisten PGK-Forschungsgruppen inzwischen arbeiten, eröffnet bessere Möglichkeiten zu Erhellung der strukturellen Variationen sowie der genetischen und zellulären Mechanismen.

4.5 Heterozygote Fibroblastenkulturen

Aufgrund der physikalischen und biochemischen Übereinstimmung der somatischen PGK-1 Allozyme ist für PGK-1A kein Selektionsvor- oder -nachteil gegenüber PGK-1B erkennbar. Bei Kultivierung heterozygoter Fibroblasten mit einem inaktivierten X-Chromosom sollte also die ursprüngliche Zusammensetzung erhalten bleiben. Da bei Mausfibroblastenkulturen häufig ohne ersichtliche Ursache einzelne Zellen die restliche Kultur überwuchern, sollten beide Phänotypen mit gleicher Wahrscheinlichkeit resultieren. In Geweben weicht die X-Chromosom-Inaktivierung vom erwarteten 50%:50%-Mosaik ab. So dominiert z.B. bei heterozygoten Mäusen die Variante PGK-1A über den Wildtyp PGK-1B mit einem Verhältnis von ca. 65:35 (Papaioannou et al., 1981). Dieses Phänomen wurde dem X-Chromosom-kontrollierenden Element Xce zugeschrieben, dessen Allele in der Reihenfolge Xce^c > Xce^b > Xce^a kompetitiv eine

zunehmende Wahrscheinlichkeit der X-Chromosom-Inaktivierung bei der Maus bedingen (Cattanach, 1975; Johnston und Cattanach, 1981). Die Ergebnisse der ersten Versuchsreihe mit je zwei Fibroblastenkulturen mit dem Mosaik 50-60% PGK-1A : 40-50% PGK-1B aus Pgk-1^a Xce^C/Pgk-1^b Xce^a-Mäusen schienen dies zu bestätigen. Nach 3-13 Populationsverdopplungen (PD) wiesen sechs (75%) von acht Linien nur mehr PGK-1A exprimierende Zellen auf, die restlichen beiden Kulturen neigten stark zum gleichen Phänotyp. Bei Homozygotie des Xce-Locus sollte demnach der PGK-1B Phänotyp fortbestehen. In einem zweiten Versuchsansatz wurden daher Pgk-1^a Xce^C/Pgk-1^b Xce^C-Fibroblasten aus Mäusen mit 50% PGK-1A und 50% PGK-1B Expression, also tatsächlich balanciertem PGK-Mosaik, in Kultur genommen. Mit einer einzigen Ausnahme resultierten auch hier in sieben (87,5%) von acht Kulturen nach 1-35 PD reine PGK-1A-Kulturen. An der PGK-1B-Kultur ist die mit dem Anteil an PGK-1A Expression schwankende Vermehrungsrate besonders gut zu erkennen (Abb. 18: Kultur-7a). Eine der beiden Kontrollkulturen mit dem doppelt heterozygoten Genotyp der ersten Versuchsreihe enthielt schließlich nach 27 PD ebenfalls nur PGK-1B-Zellen, die Parallelkultur jedoch wiederum PGK-1A-Fibroblasten. Ein Einfluß durch den Xce-Genotyp läßt sich also ausschließen. Reaktivierungsversuche der PGK-1B Expression mit 5-Azacytidin blieben erfolglos. Laut Graves (1983) scheint dies bei heterozygoten Mauszellen generell nicht möglich zu sein. Auch in einer künstlichen Mischkultur aus 50% reinen Pgk-1^a- und 50% reinen Pgk-1^b-Zellen überwucherten die Pgk-1^a-Fibroblasten. Die reinen Kulturen, FIB-1A und FIB-1B, wurden parallel mit gleichen Trypsinierungsintervallen und gleicher Zelldichte bei der Aussaat weitergeführt. FIB-1A zeigte eine etwas höhere Proliferation, die vermutlich in der Mischkultur zur Ausdünnung der Pgk-1^b-Zellen führte. FIB-1A/1B wies jedoch nach 20 PD eine doppelt so hohe Vermehrungsrate auf wie FIB-1A. Offenbar neigen Pgk-1^a-Zellen wesentlich stärker als Pgk-1^b-Zellen zu spontaner Entartung, die ihnen in Kultur mit Pgk-1^b-Zellen einen selektiven Wachstumsvorteil verschafft. Zu einem ähnlichen Ergebnis führten in vivo Versuche mit chemisch erzeugten präneoplastischen Foci in der Leber von Mäusen, die X-chromosomal einen Inzuchtkoeffizienten von 95% aufwiesen (Rabes et al., 1982; Bücher et al., 1985). Mäuse mit niedrigerer PGK-1B-Expression bilden eher Neoplasmen aus als solche mit einem höheren PGK-1B-Anteil. Von den elektrophoretisch analysierten präneoplastischen Noduli besaßen 85% den Phänotyp PGK-1A. Möglicherweise existiert ein mit dem Wildtyp Pgk-1^a eng

gekoppelter, vom Xce-Genlocus unabhängiger Genort, dessen fördernder Einfluß auf die Zellproliferation durch chemische Stimuli oder durch die künstlichen Bedingungen der Zellkultur verstärkt zum Ausdruck kommt, so daß PGK-1A-Zellen eher zu Transformation tendieren als PGK-1B-Zellen. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob hier ein Zusammenhang mit für die Cancerogenese vermuteten Schritten besteht, dem Übergang zu erhöhter Vermehrungskapazität und der dann durch weitere Faktoren induzierten, endgültigen Entartung (Pitot und Sirica, 1980).

5. ZUSAMMENFASSUNG

Nach Bestimmung noch ausstehender Charakteristika, d.h. Anzahl der Sulfhydrylgruppen, Hemmung mit Adipoyldihydrazo-ATP, Nucleotidspezifität, Thermostabilität und Abhängigkeit der Aktivität von der Ionenkonzentration, lassen sich die spermien-spezifischen Allozyme PGK-2A und PGK-2B der Maus mit den entsprechenden, anhand derselben Methodik ermittelten Werten der somatischen Allozyme PGK-1A und PGK-1B vergleichen (Tab. 25). Deutliche Unterschiede bestehen lediglich in den Ladungseigenschaften und den spezifischen Aktivitäten, sowie in der Thermostabilität: PGK-2 ist negativer geladen, weist eine niedrigere spezifische Aktivität auf und ist labiler als PGK-1.

Um eine mögliche Beeinflussung der Fertilität durch anti-PGK-2 Antikörper zu untersuchen, wurden Mäuse beiderlei Geschlechts mit 50-100 µg PGK-2 in komplettem Freund'schen Adjuvans geimpft und nach vier bis sechs Wochen mit 100-200 µg desselben Antigens in PBS geboostet. Das Ausmaß der Immunantwort wurde mittels ELISA bestimmt. NMRI-Mäuse entwickelten höhere Titer (bis zu 1000 anti-PGK-2 RK/ml Plasma, entsprechend µg/ml Standard-Maus-IgG) als C3H/Mäuse (bis 350 RK/ml Plasma). Nur minimale Antikörpermengen ließen sich durch Immunisierung von C3H/HeH-Tieren mit PGK-1 erzielen (3-5 anti-PGK-1 RK/ml Plasma). Zehn bis vierzehn Tage nach der Auffrischungsimpfung wurden die Mäuse für drei Wochen mit unbehandelten Tieren verpaart. Die Immunisierung hatte keinerlei Einfluß auf die Wurfgröße und auf das Geschlechterverhältnis der Nachkommen. Nach diesen in vivo Ergebnissen erweist sich der Ansatz einer immunologischen Fertilitätskontrolle mit spermien-spezifischer PGK-2 im Gegensatz zu den bekannten Erfolgen mit LDH-C₄ als unbrauchbar.

Größere Mengen polyklonaler Maus-Antikörper gegen PGK-2 aus Mauseihoden lassen sich über Ascitesproduktion erzeugen, wobei die Antigene PGK-2A und PGK-2B zu keinerlei Unterschieden führten. Wie auch die Plasmaantikörper der Fertilitätsversuche zeigten die Ascitesantikörper im ELISA größte Reaktivität mit PGK-2. Da die unterschiedlichen Ladungseigenschaften der PGK-Varianten verschiedene Determinanten erwarten lassen, wurden sieben Fusionen von Milzzellen gegen PGK-2 geimpfter Balb/c-Mäuse mit X63-Ag8.653-Myelomazellen zur Erzeugung monoklonaler

ler, monospezifischer Antikörper durchgeführt. Es resultierte größte Reaktivität mit PGK-2, die Reaktivität mit PGK-1, wenn auch in der Regel geringer, ließ sich allerdings auch hier nicht vermeiden. Zudem erwies sich die PGK-spezifische Antikörperproduktion der Hybridomaklone als nicht stabil.

Mit über Protein A-Sepharose chromatographierten polyklonalen und monoklonalen Antikörpern wurden Immunfluoreszenzversuche an sorgfältig gewaschenen, epidymalen Mausspermatozoen durchgeführt. Nach Vorbehandlung der Spermien mit Nonidet P40 und Mercaptoäthanol fluoreszierten die Geißelumrisse, gelegentlich auch die des Kopfes, häufig schwach diffus auch das Kopfinnere. Spermien mit PGK-2A, -2B oder -2C wiesen keinerlei Unterschiede im Anfärbungsmuster oder in der Färbungsintensität auf. Die Antikörper reagierten ebenfalls mit PGK aus Human- und Rinderspermatozoen.

Von 2 x 9 Fibroblastenkulturen aus neun weiblichen C3H/Aa-Mäusen mit dem Phänotyp 50% PGK-1A : 50% PGK-1B enthielten nach unterschiedlich langer Kulturdauer nur noch drei Linien ausschließlich PGK-1B exprimierende Zellen; zwei Linien mit erhöhtem PGK-1A Anteil wurden nicht bis zur eindeutigen Festlegung kultiviert. Alle anderen Kulturen, also 72%, wiesen nur noch PGK-1A exprimierende Zellen auf. Die Höhe der Vermehrungsrate schwankte zunächst mit der Höhe des PGK-1A Anteils und führte zur präferentiellen Selektion von PGK-1A-Zellen. Der Xce-Genotyp scheint hierbei keinen Einfluß auszuüben.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Beisenherz, G., Boltze, H.J., Bücher, Th., Garbade, K.H., Meyer-Arendt, E., Pfeleiderer, G.: Diphosphofructose-Aldolase, Phosphoglyceraldehyd-Dehydrogenase, Lactat-Dehydrogenase, Glycerophosphat-Dehydrogenase und Pyruvatkinase aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang. Z. Naturforschg. Ser. B 8: 555-576 (1953)
- Bellvé, A.R.: The molecular biology of mammalian spermatogenesis. In: Oxford Reviews of Reproductive Biology, vol. 1, C.A. Finn (Hrsg.), Oxford University Press (1979), S.159-261
- Bené, M., Goldberg, E.: Binding of antibody to LDH-X by the mouse blastocyst (1). J. Exp. Zool. 189: 261-266 (1974)
- Bensadoun, A., Weinstein, D.: Assay of proteins in the presence of interfering material. Anal. Biochem. 70: 241-249 (1976)
- Blake, C.C.F., Rice, D.W.: Phosphoglycerate kinase. Phil. Trans. R. Soc. Lon. A. 293: 93-104 (1981)
- Blanco, A., Burgos, C., Gerez de Burgos, N.M., Montamat, E.E.: Properties of the testicular lactate dehydrogenase isoenzyme. Biochem. J. 153: 165-172 (1976)
- Blüthmann, H., Cicurel, L., Kuntz, G.W.K., Haedekamp, G., Illmensee, K.: Immunohistochemical localization of mouse testis-specific phosphoglycerate-kinase (PGK-2) by monoclonal antibodies. EMBO J. 1: 479-484 (1982)
- Bücher, Th.: Über ein phosphatübertragendes Gärungsferment. Biochem. Biophys. Acta 1: 292-314 (1947)
- Bücher., Th., Bender, W., Fundele, R., Hofner, H., Linke, I.: Quantitative evaluation of electrophoretic allo- and isozyme patterns. FEBS Lett. 115: 319-324 (1980)
- Bücher, Th., Dünnwald, M., Linke, I.M., Rabes, H.M.: X-Linked Allozymes of phosphoglycerate kinase as tools in experimental carcinogenesis in the mouse. Adv. Enzyme Regul. 23: 169-179 (1985)
- Carey, J.E., Olds-Clarke, P.: Differences in sperm function in vitro but not in vivo between inbred and random-bred mice. Gamete Res. 3: 9-15 (1980)
- Cattanach, B.M.: Control of chromosome inactivation. Ann. Rev. Genet. 9: 1-18 (1975)

- Chapman, V.M., Shows, T.B.: Somatic cell genetic evidence for X-chromosome linkage of three enzymes in the mouse. *Nature* 259: 665-667 (1976)
- Chen, S.-H., Donahue, R.P., Scott, C.R.: Characterization of phosphoglycerate kinase from human spermatozoa. *Fert. Steril.* 27, 699-701 (1976)
- DeBlas, A.L., Ratnaparkhi, M.V., Mosimann, J.E.: Estimation of the number of monoclonal hybridomas in a cell fusion experiment. *Meth. Enzymol.* 92: 36-39 (1983)
- Dor, J., Rudak, E., Aitken, R.J.: Antisperm antibodies: Their effect on the process of fertilization studied in vitro. *Fert. Steril.* 35: 535-541 (1981)
- Eicher, E.M., Cherry, M., Flaherty, L.: Autosomal phosphoglycerate kinase linked to mouse major histocompatibility complex. *Molec. Gen. Genet.* 158: 225-228 (1978)
- Ellman, G.L.: Tissue sulphydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82: 70-77 (1959)
- Engvall, E.: Enzyme immunoassay ELISA and EMIT. *Meth. Enzymol.* 70: 419-439 (1980)
- Engvall, E., Perlmann, P.: ELISA III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen coated tubes. *J. Immunol.* 109: 129-135 (1972)
- Erickson, R.P.: Glucose-6-phosphate dehydrogenase activity changes during spermatogenesis: Possible relevance to X-chromosome inactivation. *Dev. Biol.* 53: 134-137 (1976)
- Erickson, R.P., Harper, K.: Variation in spermatozoal levels of phosphoglycerate kinase-2 in mice. *J. Hered.* 72: 129-130 (1981)
- Erickson, R.P., Friend, D.S., Tennenbaum, D.: Localization of lactate dehydrogenase-X on the surface of mouse spermatozoa. *Exp. Cell Res.* 91: 1-5 (1975 a)
- Erickson, R.P., Hoppe, P.C., Tennenbaum, D., Spielmann, H., Epstein, C.J.: Lactate dehydrogenase X: Effects of antibody on mouse gametes but not on early development. *Science* 188: 261-263 (1975 b)
- Erickson, R.P., Stites, D.P., Spielmann, H.: Effects on fertility of immunization against lactate dehydrogenase X in female mice. *Contraception* 12: 333-338 (1975 c)
- Erickson, R.P., Harper, K., Menge, A., Lee, C.-Y.: Immunological studies of

- the sperm-specific phosphoglycerate kinase-2 of mice. *J. Reprod. Immunol.* 1: 185-191 (1979)
- Erickson, R.P., Lewis, S.E., Butley, M.: Is haploid gene expression possible for sperm antigens? *J. Reprod. Immunol.* 3: 195-217 (1981)
- Ey, P.L., Prowse, S.J., Jenkin, C.R.: Isolation of pure IgG1, IgG2a, and IgG2b immunoglobulins from mouse serum using protein A-sepharose. *Immunochimistry* 15: 429- 436 (1978)
- Fazekas de St. Groth, S.: The evaluation of limiting dilution assays. *J. Immunol. Meth.* 49: R11-R23 (1982)
- Feuchter, F.A., Vernon, R.B., Eddy, E.M.: Analysis of the sperm surface with monoclonal antibodies: Topographically restricted antigens appearing in the epididymis. *Biol. Reprod.* 24: 1099-1110 (1981)
- Fey, H.: Eriochrome Black, a means for reduction of nonspecificity in immunofluorescence. *Path. Microbiol.* 38: 271-277 (1972)
- Gartler, S.M., Riggs, A.D.: Mammalian X-chromosome inactivation. *Ann. Rev. Genet.* 17: 155-190 (1983)
- Gold, B., Fujimoto, H., Kramer, J.M., Erickson, R.P., Hecht, N.B.: Haploid accumulation and translational control of phosphoglycerate kinase-2 messenger RNA during mouse spermatogenesis. *Dev. Biol.* 98: 392-399 (1983)
- Goldberg, E.: Isozymes in testis and spermatozoa. *Isozymes Curr. Top. Biol. Med. Res.* 1: 79-124 (1977)
- Goldberg, E.: Sperm-specific antigens and immunological approaches for control of fertility. In: *Recent Advances in Reproduction and Regulation of Fertility*, G.P. Talwar (Hrsg.), Elsevier/North Holland (1979), S. 281-290
- Graves, J.A.M.: Inactivation and reactivation of the mammalian X-chromosome - on the threshold of molecular biology. In: *Development in Mammals*. M.H. Johnson (Hrsg.), Elsevier/North Holland (1983), S. 251-295
- Grounds, M.D.: Effect of Dithiothreitol on kinetics of mammalian and non-mammalian phosphoglycerate kinase. *Comp. Biochem. Physiol.* 67B: 599-603 (1980)
- Holt, W.V.: Membrane heterogeneity in the mammalian spermatozoon. *Int. Rev. Cytol.* 87: 159-194 (1984)
- Hotta, Y., Chandley, A.C.: Activities of X-linked enzymes in spermatocytes of

- mice rendered sterile by chromosomal alterations. *Gamete Res.* 6: 65-72 (1982)
- Johnston, P.G., Cattanaach, B.M.: Controlling elements in the mouse IV: Evidence of non-random X-inactivation. *Genet. Res.* 37: 151-160 (1981)
- Jones, W.R.: *Immunological Fertility Regulation*. Blackwell (1983)
- Kearney, J.F., Radbruch, A., Liesegang, B., Rajewsky, K.: A new mouse myeloma cell line that has lost Ig expression but permits the construction of antibody secreting hybrid cell lines. *J. Immunol.* 123: 1548-1550 (1979)
- Kennett, R.H.: *Cell Fusion*. *Meth. Enzymol.* 58: 345-359 (1979)
- Kille, J.W., Goldberg, E.: Inhibition of oviductal sperm transport in rabbits immunized against sperm-specific lactate dehydrogenase (LDH-C₄). *J. Reprod. Immunol.* 2: 15-21 (1980)
- Kille, J.W., Wheat, T.E., Mitchell, G., Goldberg, E.: Strain differences in the immune response to homologous sperm-specific lactate dehydrogenase (LDH-C₄). *J. Exp. Zool.* 204: 259-265 (1978)
- Klein, J., Flaherty, L., VandeBerg, J.L., Shreffler, D.C.: H-2 haplotypes, genes, regions, and antigens: First listing. *Immunogenetics* 6: 489-512 (1978)
- Köhler, G., Milstein, C.: Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495-497 (1975)
- Kozak, L.P., McLean, G.K., Eicher, E.M.: X-Linkage of phosphoglycerate kinase in the mouse. *Biochem. Genet.* 11: 41-47 (1974)
- Kramer, J.M.: Immunofluorescent localization of PGK-1 and PGK-2 isozymes within specific cells of the mouse testis. *Dev. Biol.* 87: 30-36 (1981)
- Kramer, J.M., Erickson, R.P.: Developmental program of PGK-1 and PGK-2 isozymes in spermatogenic cells of the mouse: Specific activities and rates of synthesis. *Dev. Biol.* 37-45 (1981)
- Krietsch, W.K.G., Bücher, Th.: 3-Phosphoglycerate kinase from rabbit skeletal muscle and yeast. *Eur. J. Biochem.* 17: 568-580 (1970)
- Krietsch, W.K.G., Krietsch, H., Kaiser, W., Dünwald, M., Kuntz, G.W.K., Duhm, J., Bücher, Th.: Hereditary deficiency of phosphoglycerate kinase: A new variant in erythrocytes and leucocytes, not associated with hemolytic anemia. *Eur. J. Clin. Invest.* 7: 427-435 (1977)

- Krietsch, W.K.G., Fundele, R., Kuntz, G.W.K., Fehlau, M., Bürki, K., Illmensee, K.: The expression of X-linked phosphoglycerate kinase in the early mouse embryo. *Differentiation* 23: 141-144 (1982)
- Kuntz, G.W.K., Eber, S., Kessler, W., Krietsch, H., Krietsch, W.K.G.: Isolation of phosphoglycerate kinases by affinity chromatography. *Eur. J. Biochem.* 85: 493-501 (1978)
- Lämmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685 (1970)
- Lee, C.-Y., Niesel, D., Pegoraro, B., Erickson, R.P.: Immunological and structural relatedness of isozymes and genetic variants of 3-phosphoglycerate kinase from the mouse. *J. Biol. Chem.* 255: 2590-2595 (1980)
- Lerum, J.E., Goldberg, E.: Immunological impairment of pregnancy in mice by lactate dehydrogenase-X. *Biol. Reprod.* 11: 108-115 (1974)
- Lindmark, R., Thorén-Tolling, K., Sjöquist, J.: Binding of immunoglobulins to protein A and immunoglobulin levels in mammalian sera. *J. Immunol. Meth.* 62: 1-13 (1983)
- Littlefield, J.W.: Selection of hybrids from matings of fibroblasts in vitro and their presumed recombinants. *Science* 145: 709-710 (1964)
- Marsh, J.A., O'Hearn, P., Goldberg, E.: The role of an X-linked gene in the regulation of secondary humoral response kinetics to sperm-specific LDH-C₄ antigen. *J. Immunol.* 126: 100-106 (1981)
- Melchers, I., Rajewsky, K.: H-2 linked immune response genes: multiplicity and functional complementation. In: *The Role of Products of the Histocompatibility Gene Complex in Immune Responses*. D. Katz, B. Benacerraf (Hrsg.), Academic Press (1976), S. 283-287
- Michelson, A.M., Markham, A.F., Orkin, S.H.: Isolation and DNA sequence of a full-length cDNA clone for human X-chromosome-encoded phosphoglycerate kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80: 472-476 (1983)
- Michelson, A.M., Blake, C.C.F., Evans, S.T., Orkin, S.H.: Structure of the human phosphoglycerate kinase gene and the intron-mediated evolution of the nucleotide-binding domain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 6965-6969 (1985)
- Mishell, B.B., Shiigi, S.M.: *Selected Methods in Cellular Immunology*. W.H. Freeman & Co. (1980), S. 368-370
- Monesi, V., Geremia, R., D'Agostino, A., Boitani, C.: Biochemistry of male

- germ cell differentiation in mammals: RNA synthesis in meiotic and postmeiotic cells. *Curr. Top. Dev. Biol.* 12, 11-36 (1978)
- Mühlbacher, C.: Isolierung und Charakterisierung der somatischen Phosphoglyceratkinase aus Mäuseskelettmuskel und Vergleich zweier alleler Isoenzyme. Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München (1980)
- Mühlbacher, C., Kuntz, G.W.K., Haedenkamp, G., Krietsch, W.K.G.: Comparison of the two purified allozymes (1B and 1A) of X-linked phosphoglycerate kinase in the mouse. *Biochem. Genetics* 21: 487-496 (1983)
- Nebel, B.R., Amarose, A.P., Hackett, E.M.: Calendar of gametogenic development in the prepuberal male mouse. *Science* 134: 832-833 (1961)
- Nielsen, J.T., Chapman, V.M.: Electrophoretic variation for X-chromosome-linked phosphoglycerate kinase (PGK-1) in the mouse. *Genetics* 87: 319-325 (1977)
- Oakberg, E.F.: Duration of spermatogenesis in the mouse and timing of stages of the cycle of the seminiferous epithelium. *Am. J. Anat.* 99: 507-516 (1956)
- Obermaier, A.W.: Isolierung und Charakterisierung der spermienspezifischen Phosphoglyceratkinase der Maus. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München (1984)
- Ouchterlony, Ö., Nilsson, L.-A.: Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. In: *Handbook of Experimental Immunology*, vol. 1, D.M. Weir (Hrsg.), Blackwell (1978), S. 19.1-19.44
- Papaioannou, V.E., West, J.D., Bücher, Th., Linke, J.M.: Nonrandom X-chromosome expression early in mouse development. *Developm. Genet.* 2: 305-315 (1981)
- Peterson, R.N.: The sperm tail and midpiece. In: *Biochemistry of Mammalian Reproduction*. L.J.D. Zaneveld, R.T. Chatterton (Hrsg.), Wiley (1982), S. 553-173
- Pitot, H.C., Sirica, A.E.: The stages of initiation and promotion in hepatocarcinogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 605: 191-215 (1980)
- Rabes, H.M., Bücher, Th., Hartmann, A., Linke, J.M., Dünwald, M.: Clonal growth of carcinogen-induced enzyme-deficient preneoplastic cell population in mouse liver. *Cancer Res.* 42: 3220-3227 (1982)

- Rose, N.R., Hjort, T., Rumke, P., Harper, M.J.K., Vyazov, O.: Techniques for the detection of iso- and autoantibodies to human spermatozoa. *Clin. Exp. Immunol.* 23, 175-199 (1976)
- Rudolph, N.S., VandeBerg, J.L.: Restriction of PGK-B to spermatogenic cells: Evidence from experimentally cryptorchid mice. *Dev. Genet.* 1: 341-353 (1980)
- Seppälä, I., Sarvas, H., Péterfy, Mäkelä, O.: The four subclasses of IgG can be isolated from mouse serum by using protein A-sepharose. *Scand. J. Immunol.* 14: 335-342 (1981)
- Sijens, R.J., Thomas, A.A.M., Jackers, A., Boeyé, A.: Clonal isolation of hybridomas by manual single-cell isolation. *Hybridoma* 2, 231-234 (1983)
- Singer-Sam, J., Simmer, R.L., Keith, D.H., Shively, L., Teplitz, M., Itakura, K., Gartler, S.M., Riggs, A.D.: Isolation of a cDNA clone for human X-linked 3-phosphoglycerate kinase by use of a mixture of synthetic oligodeoxyribonucleotides as a detection probe. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80: 802-806 (1983)
- Spielmann, H., Eibs, H.-G., Mentzel, C., Nagel, D.: Studies on the binding of antibody against mouse lactate dehydrogenase (isozyme X) by preimplantation mouse embryos. *J. Reprod. Fert.* 50: 47-52 (1977)
- Stähli, C., Staehelin, Th., Miggiano, V.: Spleen cell analysis and optimal immunization for high-frequency production of specific hybridomas. *Meth. Enzymol.* 92: 26-39 (1983)
- Storey, B.T., Kayne, F.J.: Energy metabolism of spermatozoa VI. Direct intramitochondrial lactate oxidation by rabbit sperm mitochondria. *Biol. Reprod.* 16, 549-556 (1977)
- Szabo, P., Grzeschik, K.-H., Siniscalco, M.: An autosomal phosphoglycerate kinase locus maps near the HLA cluster. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81: 3167-3169 (1984)
- Toyoda, Y., Chang, M.C.: Fertilization of rat eggs in vitro by epididymal spermatozoa and the development of eggs following transfer. *J. Reprod. Fert.* 36: 9-22 (1974)
- Tung, A.S.: Production of large amounts of antibodies, nonspecific immunoglobulins, and other serum proteins in ascitic fluids of individual mice and guinea pigs. *Meth. Enzymol.* 93: 12-24 (1983)

- Tzartos, S.J.: Monoclonal antibodies as probes of the acetylcholine-receptor and myasthenia gravis. *Trends Biochem. Sci.* 9: 63-67 (1984)
- VandeBerg, J.L.: Allelic isozymes of testicular phosphoglycerate kinase B in mice (1). *Genetics* 86: s66 (1977)
- VandeBerg, J.L.: Developmental aspects of X-chromosome inactivation in eutherian and metatherian mammals. *J. Exp. Zool.* 228: 271-286 (1983)
- VandeBerg, J.L.: The phosphoglycerate kinase isozyme system in mammals: Biochemical, genetic, developmental, and evolutionary aspects. *Isozymes Curr. Top. Biol. Med. Res.* 12: 133-187 (1985)
- VandeBerg, J.L., Blohm, S.V.: An allelic isozyme of mouse PGK-2 with low activity. *J. Exp. Zool.* 201: 479-483 (1977)
- VandeBerg, J.L., Klein, J.: Localization of mouse P_{gk}-2 gene at the D end of the H-2 complex (1). *J. Exp. Zool.* 203: 319-324 (1978)
- VandeBerg, J.L., Cooper, D.W., Close, P.J.: Mammalian testis phosphoglycerate kinase. *Nature* 243: 48-49 (1973)
- VandeBerg, J.L., Cooper, D.W., Close, P.J.: Testis specific phosphoglycerate kinase B in mouse. *J. Exp. Zool.* 198: 231-240 (1976)
- VandeBerg, J.L., Lee, C.-Y., Goldberg, E.: Immunohistochemical localization of phosphoglycerate kinase isozymes in mouse testes. *J. Exp. Zool.* 217: 435-441 (1981)
- Vogel, U.: Stoffwechsellenzyme in Spermien und Seminalplasma. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München (1985)
- West, J.D., Chapman, V.M.: Variation for X-chromosome expression in mice detected by electrophoresis of phosphoglycerate kinase. *Genet. Res.* 32: 91-102 (1978)
- Wheat, T.E., Goldberg, E.: Sperm specific lactate dehydrogenase C₄: Anti-genetic structure and immunosuppression of fertility. *Isozymes Curr. Top. Biol. Med. Res.* 7: 113-130 (1983)
- Willard, H.F., Goss, S.J., Holmes, M.T., Munroe, D.L.: Regional localization of the phosphoglycerate kinase gene and pseudogene on the human X chromosome and assignment of a related DNA sequence to chromosome 19. *Human Genet.* 71: 138-143 (1985)
- Worton, R.G., Duff, C.: Karyotyping. *Meth. Enzymol.* 58: 322-344 (1979)

7. ABKÜRZUNGEN

Enzyme

PGK	ATP:3-Phospho-D-Glycerat-1-Phosphotransferase (EC 2.7.2.3)
PGK-1	somatisches, X-chromosomales Isozym, beim Menschen "PGK-A"
PGK-2	autosomales, spermienspezifisches Isozym, beim Menschen "PGK-B"
Pgk-1	Genlocus für PGK-1, beim Menschen "PGK-1"
Pgk-2	Genlocus für PGK-2, beim Menschen "PGK-2"
AP	Alkalische Phosphatase (EC 3.1.3.1)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (EC 1.2.1.12)
LDH	Lactat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.27)
Xce	X-Chromosom kontrollierendes Element, Genprodukt unbekannt

Substrate

1,3-BPG	1,3-Bisphosphoglycerat
3-PG	3-Phosphoglycerat
GAP	Glycerinaldehyd-3-Phosphat
NPP	4-Nitrophenylphosphat
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinucleotid, oxidiert
AMP	Adenosin-5'-Monophosphat
ADP	Adenosin-5'-Diphosphat
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
dATP	2'-Desoxy-Adenosin-5'-Triphosphat
ATPP	Adenosintetraphosphat
ITP	Inosin-5'-Triphosphat
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat
UTP	Uridin-5'-Triphosphat
CTP	Cytidin-5'-Triphosphat

Zellen

FIB	Fibroblasten
HY	Hybridoma
MY	Myeloma

Puffer, Chemikalien, Verfahren

AS	Ammoniumsulfat
BSA	Rinderserumalbumin
CFA	komplettes Freundsches Adjuvans
CPD	cumulative Populationsverdopplungen
DMEM	Dulbecco's Minimum Essential Medium
DTE	1,4-Dithioerythrit
DTNB	5,5-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure)
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
F-12	von R.G.Ham entwickeltes Zellkultur-Nährgemisch
FCS	foetales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
GDA	Glutardialdehyd
HAT	Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin
HT	Hypoxanthin-Thymidin
IFA	inkomplettes Freundsches Adjuvans
i.m.	intramuskulär
i.p.	intraperitoneal
NP40	Nonidet P40

PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PAS	Protein A-Sepharose
PD	Populationsverdopplung
PBS	Phosphatgepufferte Saline (Kochsalzlösung)
PEG	Polyäthylenglycol
Pristan	2,4,10,14-Tetramethyl-pentadecan
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SE	spezifische Effizienz
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
TMED	N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin
TRA	Triäthanolamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

Mein herzlicher Dank gilt all jenen, die das Entstehen dieser Arbeit mit Rat, Tat und Geräten unterstützten!

Diese Arbeit wurde mit Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Projekte Kr 488/3, Za 21/21-2, Za 21/21-5 und SFB 0304 gefördert.

LEBENS LAUF

Name	Gesa Haedenkamp
geboren	am 7.8.1953 in München
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig
Eltern	Dr. med. Hermann Haedenkamp, Internist Dr. med. Antje Vogel, geb. Hinrichs, Anaesthesistin

SCHULEN

1959-1963	Evangelische Volksschule Bad Reichenhall
1963-1964	Karls gymnasium / Oberrealschule Bad Reichenhall
1964-1967	Internat Neubauern, neu sprachliches Gymnasium
1967-1972	Rudolf-Steiner-Schule München
Juni 1972	Abitur am Oskar-von-Miller-Gymnasium München

AUSLANDSAUFENTHALT

1972-1973	akademisches Jahr am Randolph Macon Woman's College in Lynchburg / Virginia, USA
-----------	---

STUDIUM

1973-1980	Diplombiologie an der Ludwig-Maximilians-Universität in München, Vordiplom 1976, Hauptdiplom 1979
1979-1980	Diplomarbeit am Zoologischen Institut der Universität München bei Dr. rer. nat. Achim Raab
Thema	Auswirkungen des sozialen Konflikts auf die Androgen- rezeptoren im Zentralnervensystem bei dominanten und unterlegenen Mäusen.
1980-1985	Promotion am Institut für Physiologische Chemie, Phy- sikalische Biochemie und Zellbiologie der Universität München bei Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang Krietsch

BERUFLICHE TÄTIGKEIT

seit August 1985	angestellt bei der Firma Hormon-Chemie in Mün- chen, Abteilung Experimentelle Forschung
------------------	--

